



Vânia Sofia Neves Ribeiro

Licenciada em Ciências de Engenharia do Ambiente

**Contribuição para o estudo da remoção
de 17 β -Estradiol e 17 α -Ethinilestradiol
em água residual tratada em discos
biológicos**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia do
Ambiente, perfil de Engenharia Sanitária

Orientador: Prof. Doutora Rita Maurício Rodrigues Rosa,
Professora Auxiliar, Faculdade de Ciências e Tecnologia,
Universidade Nova de Lisboa.

Co-orientador: Prof. Doutor João Paulo da Costa de Noronha,
Professor Auxiliar, Faculdade de Ciências e Tecnologia,
Universidade Nova de Lisboa.

Júri:

Presidente e Arguente: Prof. Doutor António Pedro de Macedo Coimbra Mano

Vogais: Prof. Doutora Rita Maurício Rodrigues Rosa

Prof. Doutora Leonor Miranda Monteiro do Amaral

Doutora Maria Isabel Araújo Pinto



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Fevereiro de 2017



Vânia Sofia Neves Ribeiro

Licenciada em Ciências de Engenharia do Ambiente

**Contribuição para o estudo da remoção
de 17 β -Estradiol e 17 α -Etinilestradiol
em água residual tratada em discos
biológicos**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia do
Ambiente, perfil de Engenharia Sanitária

Orientador: Prof. Doutora Rita Maurício Rodrigues Rosa,
Professora Auxiliar, Faculdade de Ciências e Tecnologia,
Universidade Nova de Lisboa.

Co-orientador: Prof. Doutor João Paulo da Costa de Noronha,
Professor Auxiliar, Faculdade de Ciências e Tecnologia,
Universidade Nova de Lisboa.

Júri:

Presidente e Arguente: Prof. Doutor António Pedro de Macedo Coimbra Mano

Vogais: Prof. Doutora Rita Maurício Rodrigues Rosa

Prof. Doutora Leonor Miranda Monteiro do Amaral

Doutora Maria Isabel Araújo Pinto



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Fevereiro de 2017

Contribuição para o estudo da remoção de 17β -Estradiol e 17α -Ethinilestradiol em água residual tratada em discos biológicos

© Copyright em nome de Vânia Sofia Neves Ribeiro, da FCT/UNL e da UNL

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Agradecimentos

À VALORMED pelo apoio financeiro ao projeto que permitiu a realização desta dissertação;

À ETAR de Fernão Ferro pela água residual fornecida para a realização desta dissertação;

À minha orientadora, Professora Doutora Rita Maurício, por toda a ajuda prestada ao longo desta fase, nomeadamente, a sua orientação, apoio, incentivo e a sua disponibilidade;

Ao meu co-orientador, Professor Doutor João Paulo Noronha, por todos os seus ensinamentos de química e por se prontificar a esclarecer qualquer questão;

À Professora Doutora Leonor Amaral que também me acompanhou nesta fase e sempre demonstrou o seu apoio e disponibilidade para qualquer situação;

À Doutora Isabel Pinto que foi uma ajuda incansável ao longo do percurso laboratorial e por me esclarecer todas as dúvidas relacionadas com a parte química e analítica dos ensaios;

Mais uma vez, à Professora Doutora Rita Maurício, Professora Doutora Leonor Amaral, Professor Doutor Pedro Coelho, à Rita Correia e à Rita Dias pela ajuda e pelo transporte nas idas à ETAR para a recolha da água residual;

À Dona Luísa e Dona Adélia, pela sua disponibilidade, auxílio, paciência, boa disposição e pela companhia diária ao longo da fase laboratorial. Também à Doutora Helena por toda a ajuda prestada ao longo desta etapa;

À Carolina e à Sandra, pela ajuda, conselhos e bases fornecidas para a realização deste trabalho;

Às minhas colegas de laboratório, pela união, amizade e entreajuda demonstrada ao longo desta fase;

À minha família que sempre me apoiou, em especial aos meus pais, por toda a ajuda e carinho, por acreditarem em mim e por lutarem pelo meu futuro e pela realização dos meus sonhos tanto quanto eu, um enorme obrigada;

A todos os amigos que fiz nesta etapa da minha vida e que sempre tiveram presentes, nos bons e maus momentos, em especial à Lisandra e à Rita, que foram dois pilares fundamentais ao longo destes anos;

Aos meus colegas de casa que me acompanharam e apoiaram durante esta última fase do meu percurso académico, sem eles não era a mesma coisa.

Resumo

Os compostos desreguladores endócrinos (EDC) são capazes de alterar funções do sistema endócrino e prejudicar a saúde de organismos. Podem ser encontrados nos meios aquáticos, nomeadamente, nas águas superficiais e subterrâneas, efluentes das Estações de Tratamento de Águas Residuais (ETAR), água potável, sedimentos marinhos e solo. São introduzidos no ambiente continuamente em concentrações detetáveis e significativas que podem afetar a qualidade da água e os ecossistemas.

Este trabalho foi desenvolvido com o objetivo de melhorar os processos de remoção do estrogénio natural 17β -Estradiol (E2) e do seu estrogénio sintético, o 17α -Ethinilestradiol (EE2), que estão associados à contaminação de águas superficiais, subterrâneas e residuais. Foram efetuados ensaios com recurso a um reator de discos biológicos à escala laboratorial, simulando uma etapa de tratamento terciário que poderá ser implementada numa ETAR.

Os ensaios foram realizados com uma água residual real, proveniente de uma ETAR, tendo consistido no estudo do crescimento do biofilme com este tipo de substrato e na remoção de E2 e EE2. Para controlo dos ensaios foram analisados vários parâmetros, nomeadamente a carência química de oxigénio (CQO), pH e sólidos suspensos totais e voláteis (SST e SSV). O método de extração utilizado foi de extração sortiva em barra de agitação (SBSE) e o método de determinação foi através de cromatografia líquida de alta resolução com detetor de fotodíodos (HPLC-DAD).

As eficiências de remoção médias do E2 variaram entre 76% no primeiro ensaio e 59% no segundo ensaio. Relativamente ao EE2, que só foi testado no segundo ensaio, não se registou uma remoção do composto. A eficiência de remoção do E2 (média dos dois ensaios) foi de 68%, o que se considera bastante razoável face às concentrações elevadas com que se trabalhou e face às eficiências de remoção registadas noutros trabalhos, recorrendo a sistemas de tratamento equivalentes ao utilizado.

Desta forma, a adoção de um tratamento biológico através de discos biológicos parece ser uma solução a ter em consideração para a remoção de EDC em águas residuais.

Palavras-chave: Compostos Desreguladores Endócrinos, 17β -Estradiol, 17α -Ethinilestradiol, Tratamento de Águas Residuais, Reator de Discos Biológicos, SBSE, HPLC-DAD.

Abstract

Endocrine disrupting compounds (EDC) are able to change endocrine system functions and damage the health of organisms. They can be found in aquatic environments, namely, in surface water and groundwater, effluents from wastewater treatment plants (WWTP), potable water, marine sediments and soils. They are introduced into the environment continuously, in detectable and significant concentrations that may affect water quality and ecosystems.

This work was developed with the purpose of improve the removal processes of natural estrogen 17β -Estradiol (E2) and his synthetic estrogen, the 17α -Ethinylestradiol (EE2), which are associated with the contamination of surface water, groundwater and wastewater. Were performed tests using a rotating biological contactor at laboratory scale and a wastewater, simulating a tertiary treatment stage that can be implemented in WWTP.

The tests were performed with real wastewater, from a WWTP, consisted in the study of the biofilm growth and the removal of E2 and EE2. To control the tests were analyzed several parameters, namely, the chemical oxygen demand (COD), pH and total and volatile suspended solids. The method of extraction used was stir bar sorptive extraction (SBSE) and the method of determination was high performance liquid chromatography with diode-array detection (HPLC-DAD).

The average removal efficiencies of the E2 ranged between 76% in the first test and 59% in the second test. Regarding to EE2, which was only study in the second test, there was no removal of the compound. The removal efficiency of the E2 (average of the two tests) was, 68%, which is quite reasonable in relation to the high concentrations worked on the tests and in relation to the removal efficiencies recorded in other works, using treatment systems equivalent to that used.

In this way, the adoption of a biological treatment through rotating biological contactors, seems to be a solution to take into account for the removal of EDC in wastewaters.

Key-words: Endocrine Disrupting Compounds, 17β -Estradiol, 17α -Ethinylestradiol, wastewater treatment, Rotating Biological Contactor, SBSE, HPLC-DAD.

Índice

1. Introdução	1
1.1. Objetivos da Tese	1
2. Revisão Bibliográfica	3
2.1. Compostos Desreguladores Endócrinos (EDC)	3
2.1.1. Classes de EDC	5
2.1.2. Características dos EDC em estudo	6
2.1.3. Sistema Endócrino	9
2.1.4. Fontes de EDC e Efeitos nos seres vivos	10
2.1.5. Enquadramento Legal	14
2.2. Sistemas de Tratamento de Águas Residuais	16
2.2.1. Tratamento Preliminar	17
2.2.2. Tratamento Primário	17
2.2.3. Tratamento Secundário	18
2.2.4. Tratamento Terciário	19
2.3. Métodos analíticos e Técnicas de quantificação de EDC	22
2.3.1. Extração Sortiva em Barra de Agitação (SBSE)	22
2.3.2. Cromatografia Líquida de Alta Resolução (HPLC-DAD)	24
2.4. Caracterização da ETAR de Fernão Ferro	25
2.4.1. Características da água residual	26
3. Plano Experimental	27
4. Materiais e Métodos	29
4.1. Materiais	29
4.1.1. Água residual	31
4.1.2. Água residual sintética	32
4.1.3. Material	32
4.2. Métodos	34
4.2.1. Crescimento do biofilme	34
4.2.2. Modo operativo utilizado nos Ensaios	34
4.2.3. Parâmetros de Controlo	38

4.2.4. Curvas de Calibração e determinação do Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ)	39
4.2.5. Ensaio 1 com uma concentração de 100 µg.L ⁻¹ de E2.....	40
4.2.6. Ensaio 2 com uma concentração de 100 µg.L ⁻¹ de E2 e EE2	41
4.2.7. Método de quantificação do E2 e EE2 pelo processo de extração SBSE	42
4.2.8. Métodos analíticos realizados no decorrer dos ensaios.....	43
5. Resultados e Discussão	45
5.1. Curvas de Calibração utilizadas nos ensaios.....	45
5.2. Ensaio 1 com uma concentração de 100 µg.L ⁻¹ de E2	46
5.3. Métodos analíticos auxiliares	50
5.3.1. Curva de Calibração em Metanol	50
5.3.2. Curva de Calibração direta	52
5.3.3. Fotodegradação de E2 e EE2.....	53
5.3.4. Adsorção de E2 e EE2 ao <i>acrodisc</i>	54
5.4. Ensaio 2 com uma concentração de 100 µg.L ⁻¹ de E2 e EE2.....	55
6. Conclusões	61
6.1. Desenvolvimentos Futuros	61
7. Bibliografia.....	63
 Anexo I. Ficha de Segurança do Composto E2.....	 69
Anexo II. Ficha de Segurança do Composto EE2	77
Anexo III. Determinação da CQO	85
Anexo IV. Determinação dos SST, SSV e SSNV	87
Anexo V. Cromatogramas da Curva de Calibração e valores associados	89
Anexo VI. Cromatogramas dos brancos em água desmineralizada e determinação do LD e LQ.....	91
Anexo VII. Determinação da concentração de CQO associada ao metanol presente nos padrões de E2 e EE2	93
Anexo VIII. Parâmetros de Controlo referentes ao Ensaio 1	95
Anexo IX. Cromatogramas correspondentes ao Ensaio 1.....	97
Anexo X. Parâmetros de Controlo referentes ao Ensaio 2.....	101
Anexo XI. Cromatogramas correspondentes ao Ensaio 2.....	103

Anexo XII. Cromatogramas da Curva de Calibração em Metanol.....	107
Anexo XIII. Cromatogramas da Curva de Calibração Direta	109
Anexo XIV. Cromatogramas da Fotodegradação de E2 e EE2.....	111
Anexo XV. Cromatogramas da adsorção de E2 e EE2 ao <i>acrodisc</i>	113

Índice de Figuras

Figura 2.1. sistema endócrino humano, nomeadamente, as glândulas endócrinas do homem e da mulher.....	9
Figura 2.2. Contribuição estimada da excreção total de estrogénios naturais (E1, E2 e E3) e do estrogénio sintético EE2.....	11
Figura 2.3. Reator de discos biológicos	20
Figura 2.4. Reator de discos biológicos com biofilme desenvolvido, utilizado no presente estudo.....	21
Figura 2.5. Etapas de formação de um biofilme.....	21
Figura 2.6. Representação esquemática da constituição da barra de agitação, dos modos de operação relativos à extração e à retroextração, utilizados na técnica de SBSE.	23
Figura 2.7. Equipamento HPLC-DAD utilizado neste estudo.....	24
Figura 2.8. Vista aérea da ETAR de Fernão Ferro.	25
Figura 2.9. Sequência de tratamento da ETAR de Fernão Ferro.	26
Figura 4.1. Esquema da instalação piloto utilizada no plano experimental	30
Figura 4.2. Instalação piloto utilizada no plano experimental	30
Figura 4.3. Vista detalhada da instalação piloto.....	31
Figura 4.4. Recolha da água residual utilizada no trabalho experimental.	31
Figura 4.5. Primeiras etapas do processo de extração com a técnica SBSE.....	35
Figura 4.6. Etapas do processo de dessorção.....	35
Figura 4.7. Equipamento de ultrassons.....	36
Figura 4.8. Etapas do processo de preparação da amostra para a injetar no HPLC-DAD	37
Figura 4.9. Etapa de injeção no HPLC-DAD	38
Figura 4.10. Potenciómetro utilizado para medir o pH da alimentação	39
Figura 4.11. Material utilizado na última filtração da amostra.	41
Figura 5.1. Curva de Calibração de E2 utilizada ao longo dos ensaios.	45

Figura 5.2. Curva de Calibração de EE2 utilizada no segundo ensaio.....	45
Figura 5.3. Desenvolvimento do biofilme no decorrer do primeiro ensaio.	47
Figura 5.4. Eficiência de remoção de E2 ao longo do primeiro ensaio.....	48
Figura 5.5. Concentrações diárias de CQO à entrada e saída do reator, ao longo do primeiro ensaio.	49
Figura 5.6. Curva de Calibração em metanol de E2.	50
Figura 5.7. Curva de Calibração em metanol de EE2.....	50
Figura 5.8. Comparação da curva de calibração em metanol com a curva de calibração em água desmineralizada para o E2.....	51
Figura 5.9. Comparação da curva de calibração em metanol com a curva de calibração em água desmineralizada para o EE2.	51
Figura 5.10. Curva de Calibração direta para o E2.....	52
Figura 5.11. Curva de Calibração dedireta para o EE2.	52
Figura 5.12. Desenvolvimento do biofilme no decorrer do segundo ensaio.	55
Figura 5.13. Eficiência de remoção de E2 ao longo do segundo ensaio.	57
Figura 5.14. Eficiência de remoção de EE2 ao longo do segundo ensaio.	57
Figura 5.15. Concentrações diárias de CQO à entrada e saída do reator, ao longo do segundo ensaio.	58

Índice de Figuras – Anexos

Figura V.1. Espectros de absorção dos fármacos E2 e EE2 na gama 215 – 320 nm.....	89
Figura V.2. Cromatograma com os tempos de retenção dos fármacos E2 ($t_r=4,44$ min) e EE2 ($t_r=5,55$ min).	89
Figura V.3. Cromatogramas de alguns padrões utilizados na elaboração das curvas de calibração, com concentrações de 25, 50, 100 e 200 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de E2 e EE2.	90
Figura VI.1. Cromatogramas referentes aos brancos preparados em água desmineralizada. .	91
Figura VIII.1. Evolução da concentração dos SST ao longo do Ensaio 1.	96

Figura IX.1. Cromatogramas alusivos à AR utilizando ao longo do primeiro ensaio.	97
Figura IX.2. Cromatogramas referentes aos dias 0, 1, 2, 3 e 4 do primeiro ensaio, com uma concentração de 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de E2.	98
Figura IX.3. Cromatogramas referentes aos dias 5, 6, 7 e 8 do primeiro ensaio, com uma concentração de 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de E2..	98
Figura X.1. Evolução da concentração dos SST ao longo do Ensaio 2.....	102
Figura XI.1. Cromatogramas alusivos à AR utilizando ao longo do segundo ensaio..	103
Figura XI.2. Cromatogramas referentes aos dias 0, 1, 2, 3 e 4 do segundo ensaio, com uma concentração de 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de E2 e EE2.	104
Figura XI.3. Cromatogramas referentes aos dias 5, 6, 7 e 8 do segundo ensaio, com uma concentração de 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de E2 e EE2.	104
Figura XII.1. Cromatogramas de alguns padrões utilizados na elaboração das curvas de calibração em metanol, com concentrações de 50, 100 e 200 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de E2 e EE2	107
Figura XIII.1. Cromatogramas de alguns padrões utilizados na elaboração das curvas de calibração diretas, com concentrações de 200, 500, 1000 e 2000 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de E2 e EE2.	109
Figura XIV.1. Cromatogramas de algumas amostras diretas referentes ao teste de fotodegradação de E2 e EE2.	111
Figura XV.1. Cromatogramas correspondentes às amostras de água desmineralizada e de água residual sintética, com e sem filtração, ambas com uma concentração de 200 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de E2 e EE2.....	113
Figura XV.2. Cromatogramas correspondentes às amostras da solução mãe dos compostos e de água residual, com e sem filtração, ambas com uma concentração de 200 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de E2 e EE2.....	113

Índice de Tabelas

Tabela 2.1. Evolução histórica dos fatos e evidências relativos aos efeitos adversos causados pelos EDC.	4
Tabela 2.2. Características químicas do E2 e EE2.	6
Tabela 2.3. Concentrações médias e intervalos de concentrações do E2, detetadas no ambiente.....	7
Tabela 2.4. Concentrações médias e faixas de concentrações do EE2, detetadas no ambiente.	8
Tabela 2.5. Excreção diária <i>per capita</i> de estrogénio, em µg	11
Tabela 2.6. Excreções diárias de estrogénio total estimadas por diferentes espécies de animais.	12
Tabela 2.7. Alguns efeitos dos EDC associados aos seres vivos.	13
Tabela 2.8. Resumo histórico de alguns seminários, comités e relatórios de avaliação sobre os EDC	15
Tabela 2.9. Processos de tratamento associados à remoção de EDC.	17
Tabela 2.10. Percentagens de remoção de alguns EDC e respetivos processos de tratamento.	19
Tabela 2.11. Vantagens e limitações associadas à técnica SBSE.	22
Tabela 2.12. Características quantitativas e qualitativas médias atuais do afluente e os requisitos de qualidade do efluente tratado na ETAR de Fernão Ferro.	26
Tabela 3.1. Plano experimental do presente trabalho.	27
Tabela 3.2. Resumo das condições iniciais dos ensaios realizados.	27
Tabela 4.1. Características da instalação piloto de discos biológicos.....	29
Tabela 4.2. Composição do efluente doméstico simulado	32
Tabela 5.1. Valores de LD e LQ correspondentes a cada fármaco em estudo.	46
Tabela 5.2. Concentrações de E2 à saída do reator, referentes ao primeiro ensaio.....	48
Tabela 5.3. Eficiência de remoção de CQO ao longo do primeiro ensaio.....	49

Tabela 5.6. Concentrações de E2 e EE2 ao longo de 6 dias e expostos à luz solar, com uma concentração inicial de 500 µg.L ⁻¹	53
Tabela 5.7. Concentrações de E2 e EE2 ao longo de 6 dias e desprovidos de luz solar, com uma concentração inicial de 500 µg.L ⁻¹	53
Tabela 5.8. Resultados das leituras das amostras não filtradas.	54
Tabela 5.9. Resultados das leituras de amostras filtradas com <i>acrodisc</i>	54
Tabela 5.4. Concentrações de E2 e EE2 à saída do reator, referentes ao segundo ensaio.	56
Tabela 5.5. Eficiência de remoção de CQO ao longo do segundo ensaio.	59

Índice de Tabelas – Anexos

Tabela V.1. Valores correspondentes aos TRC, às áreas e à média das áreas utilizados para a elaboração das curvas de calibração de E2 e EE2.	90
Tabela VI.1. Valores dos TRC, áreas do pico e respectivas concentrações de E2 e EE2 correspondentes aos brancos de água desmineralizada, necessários para calcular o LD e LQ.	91
Tabela VII.1. Valores de CQO t utilizados para determinar a concentração de CQO associada ao metanol presente nos padrões de E2 e EE2.	93
Tabela VII.2. Cálculos para determinar a contribuição em termos de CQO, do metanol usado para preparar a solução mãe do fármaco utilizado no primeiro ensaio.	93
Tabela VII.3. Cálculos para determinar a contribuição em termos de CQO, do metanol usado para preparar a solução mãe dos fármacos utilizados no segundo ensaio.	93
Tabela VIII.1. Controlo diário de CQO à entrada e saída do reator, durante o primeiro ensaio.	95
Tabela VIII.2. Controlo diário de SST, SSNV e SSV à saída do reator, ao longo do primeiro ensaio.	95
Tabela IX.1. Valores correspondentes aso tempos de retenção, áreas do pico e concentrações de E2, no decorrer do primeiro ensaio.	99
Tabela IX.2. Eficiência de remoção de E2, ao longo do primeiro ensaio.	99
Tabela X.1. Controlo diário de CQO à entrada e saída do reator, durante o Ensaio 2.	101

Tabela X.2. Controlo diário de SST, SSNV e SSV à saída do reator, ao longo do Ensaio 2. .	101
Tabela XI.1. Valores correspondentes ao tempo de retenção, área do pico e concentração de E2 e EE2, no decorrer do segundo ensaio.	105
Tabela XI.2. Eficiência de remoção de E2 e EE2, ao longo do segundo ensaio.	105
Tabela XII.1. Valores correspondentes aos TRC, às áreas e à média das áreas utilizados para a elaboração das curvas de calibração em metanol de E2 e EE2.	107
Tabela XIII.1. Valores correspondentes aos TRC, às áreas e à média das áreas utilizados para a elaboração das curvas de calibração diretas de E2 e EE2.	109
Tabela XIV.1. Valores correspondentes aos tempos de retenção, áreas dos picos e concentrações de E2 e EE2, quando expostos à luz solar ao longo de 5 dias.	111
Tabela XIV.2. Valores correspondentes aos tempos de retenção, áreas dos picos e concentrações de E2 e EE2, quando desprovidos de luz solar ao longo de 5 dias.	112
Tabela XV.1. Valores correspondentes aos tempos de retenção, áreas dos picos e concentrações de E2 e EE2, das amostras não filtradas.	114
Tabela XV.2. Valores correspondentes aos tempos de retenção, áreas dos picos e concentrações de E2 e EE2, das amostras filtradas com <i>acrodisc</i>	114

Símbolos e Abreviaturas

AR: Água Residual

CaCl₂.2H₂O: Cloreto de Cálcio

CH₃CN: Acetonitrilo

CH₃OH: Metanol

CQO: Carência Química de Oxigênio

DDE: Diclorodifenildicloroetano

DDT: Diclorodifeniltricloroetano

DMSO: Dimetilsulfóxido

E1: Estrona

E2: 17β-Estradiol

E3: Estriol

EDC: Composto Desregulador Endócrino (*Endocrine Disruptor Chemicals*)

EE2: 17α-Etinilestradiol

ETAR: Estação de Tratamento de Águas Residuais

FeCl₃.6H₂O: Cloreto de Ferro (III) (hexahidratado)

HCOOH: Ácido Fórmico

HPLC-DAD: Cromatografia Líquida de Alta Resolução com detetor de Fotodíodos (*High Performance Liquid Chromatography with Diode-Array Detection*)

KH₂PO₄: Fosfato de Monopotássio, Dihidrogenofosfato de Potássio

LD: Limite de Detecção

Log K_{ow}: Coeficiente de Partição Octanol-Água

LQ: Limite de Quantificação

MgSO₄.7H₂O: Sulfato de Magnésio (heptahidratado)

MnSO₄.5H₂O: Sulfato de Manganês (pentahidratado)

NaCl: Cloreto de Sódio

(NH₄)₂SO₄: Sulfato de Amônio

PAH: Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos

PCB: Bifenilos Policlorados

PDMS: Polidimetilsiloxano

pK_a: Constante de Acidez

RBC: Reator de Discos Biológicos (*Rotating Biological Contactor*)

REACH: Registo, Avaliação, Autorização e Restrição de substâncias químicas

rpm: Rotações por minuto

SBSE: Extração Sortiva em Barra de Agitação (*Stir Bar Sorptive Extraction*)

SPME: Microextração em fase Sólida (*Solid Phase Microextraction*)

SSNV: Sólidos Suspensos Não Voláteis

SST: Sólidos Suspensos Totais

SSV: Sólidos Suspensos Voláteis

TRC: Tempo de Retenção do Composto

UV: Radiação Ultravioleta

VTG: Vitelogenina

1. Introdução

A produção e descarga de produtos químicos sintéticos para o ambiente têm aumentado significativamente nos últimos 50 anos, devido ao crescimento exponencial da populacional e da industrialização. Milhares de compostos orgânicos são descarregados todos os dias nos sistemas aquáticos através de descargas de águas residuais domésticas e industriais (Gomez *et al.*, 2011). Outra importante fonte para o ambiente deste tipo de compostos são as fontes de poluição difusas, nomeadamente o uso de fertilizantes na agricultura ou a deposição atmosférica de poluentes provenientes de veículos e indústrias, que contribuem igualmente para a dispersão destes poluentes (Johnsen & Karlson, 2007).

Os compostos desreguladores endócrinos (EDC) são capazes de alterar funções do sistema endócrino e prejudicar a saúde de organismos. Podem ser encontrados nos meios aquáticos, nomeadamente, nas águas superficiais e subterrâneas, efluentes das ETAR e água potável, e em sedimentos marinhos e no solo. São introduzidos no ambiente continuamente a concentrações que podem afetar a qualidade da água e os ecossistemas (Américo *et al.*, 2012). Atualmente, os EDC não são considerados mutagénicos nem com carácter de toxicidade aguda, nas concentrações presentes no ambiente, e por isso, são ainda libertados sem as devidas precauções (Colborn *et al.*, 1993).

A exposição ao estrogénio EE2 tem sido associada à feminização dos peixes machos o que leva ao declínio da sua fertilidade. Outros efeitos como anomalias no sistema reprodutivo, alterações nas funções imunológicas, alterações na produção de ovos e até casos de hermafroditismo, estão associados à exposição dos seres vivos a EDC presentes no meio ambiente (Flores-Valverde *et al.*, 2010).

1.1. Objetivos da Tese

Este trabalho teve como objetivo contribuir para o estudo da remoção biológica de E2 e EE2 de águas residuais tratadas, através de reatores de discos biológicos. Para a sua realização, recorreu-se a uma instalação piloto de discos biológicos à escala laboratorial, especialmente desenvolvida para este tipo de estudos. Para a prossecução dos estudos, utilizou-se água residual real proveniente de uma ETAR.

Com este estudo, pretendeu-se estudar a eficiência de remoção de desreguladores endócrinos num efluente real, de forma a contribuir para um conhecimento mais aprofundado dos mecanismos de remoção destes compostos, nos sistemas de tratamento biológicos.

A utilização deste tipo de sistema de tratamento, e as condições de alimentação dos reatores (nomeadamente a CQO) foram selecionadas para que fosse avaliada a possibilidade e inclusão de um tipo de tratamento semelhante numa etapa já avançada do tratamento, nomeadamente num tratamento de afinação.

2. Revisão Bibliográfica

A presença de contaminantes químicos no meio aquático tem sido uma preocupação para a comunidade científica internacional, uma vez que, anualmente são sintetizados diversos compostos químicos, que por sua vez, são lançados para o ambiente com consequências desconhecidas (Gaffney *et al.*, 2014). Os contaminantes emergentes englobam uma diversidade de compostos, incluindo cianotoxinas, aditivos de gasolina e industriais, hormonas esteróides, produtos farmacêuticos e de cuidado pessoal, entre outros (Farré *et al.*, 2008).

Os estudos realizados até à data têm identificado em diferentes matrizes, nomeadamente, águas residuais, águas superficiais e subterrâneas, vários fármacos de diferentes classes, incluindo analgésicos, antibióticos, antidepressivos e contraceptivos orais (Bialk-Bielinska *et al.*, 2009; Salgado *et al.*, 2010).

2.1. Compostos Desreguladores Endócrinos (EDC)

A constatação de efeitos prejudiciais, causados em várias populações da fauna selvagem e até no próprio Homem, foi o ponto de partida para a eclosão mundial de várias pesquisas sobre os desreguladores endócrinos (Nogueira, 1999).

Na última década, a exposição das águas superficiais a vários produtos farmacêuticos e de cuidados pessoais tornou-se num assunto bastante sensível. Estes compostos são muito comuns nos efluentes de ETAR e apesar do risco ecológicos e da ameaça à qualidade da água de consumo humano, não foram criadas Leis relativas à remoção de EDC no tratamento de águas residuais (Vasiliadou *et al.*, 2014).

Na **Tabela 2.1**, mostra-se um resumo da evolução histórica dos fatos e evidências relativos aos efeitos adversos causados pelos EDC.

Tabela 2.1. Evolução histórica dos fatos e evidências relativos aos efeitos adversos causados pelos EDC (adaptado de Bila & Dezotti, 2007; Nogueira, 1999).

Ano	Acontecimento
1923	Deteta-se atividade estrogénica em extratos biológicos.
1950	Observa-se que o diclorodifeniltricloroetano (DDT) evidencia atividade estrogénica.
1962	Surgem as primeiras correlações entre os pesticidas/químicos sintéticos e os problemas de saúde ambiental.
1963	Verifica-se que a exposição a hormonas naturais é perigosa e pode conduzir a cancro.
1965	Publicação de um artigo sobre a presença de compostos estrogénicos em águas residuais
1968	Descobre-se que o DDT apresenta atividade estrogénica nos mamíferos e aves.
1971	Verifica-se que o diclorodifenildicloroetano (DDE) está na origem do cancro vaginal.
1972	O DDT é proibido na agricultura.
1976	Verifica-se que o DDE está interligado a problemas na reprodução humana.
1977	A produção e aplicação de bifenilos policlorados (PCB) é restringida.
1980	A utilização de certas hormonas sintéticas é restringida.
1991	Primeira vez que se utilizou o termo "Desregulador Endócrino".
1992	Primeira publicação em que o termo é referido.
1993	Deteta-se relação entre os xeno-estrogénios e problemas no aparelho reprodutivo masculino e feminino.
1996	Verifica-se que combinações de diferentes xeno-estrogénios apresentam sinergismos em vários tipos de leveduras.
1998	Formam-se os primeiros grupos de investigação a nível mundial para estudar e dar resposta a esta problemática.
1999	Desenvolvem-se estudo <i>in-vitro</i> e <i>in-vivo</i> conducentes à elaboração de listas de substâncias classificadas como contendo potencial atividade estrogénica.
2006	O regulamento no qual se refere o Registo, Avaliação, Autorização e Restrição de substâncias químicas (REACH) foi adotado.
2011	A partir deste ano, qualquer composto que pertença à lista de EDC ou que seja candidato, tem que ser reportado à Agência Europeia de Químicos.

Desregulador Endócrino é o termo associado a toda a substância ou mistura de substâncias exógenas, capazes de assumir funções semelhantes à hormona natural dos seres

vivos ou inibir o funcionamento normal da mesma, alterando as funções do sistema endócrino e prejudicar a saúde do organismo ou de uma população (Nogueira, 1999).

Geralmente, estas substâncias são poluentes químicos e derivados de químicos antropogênicos, provenientes de pesticidas, plásticos, detergentes, lacas, tintas e outros materiais que constituem diversos tipos de resíduos industriais ou domésticos. São compostos muito estáveis, lipofílicos e semi-voláteis, também designados por poluentes orgânicos persistentes, facilitando uma dispersão ambiental rápida e extensa (Nogueira, 1999).

Os efeitos dos EDC na saúde podem ser sentidos até muito tempo depois de se ter dado a exposição a estas substâncias, quando esta se dá no útero, os efeitos podem passar para a geração seguinte. Estes efeitos não dependem só da sua concentração no ambiente, porque mesmo em concentrações vestigiais, a sua persistência, biotransformação, tempo de exposição e bioacumulação, são fatores determinantes da gravidade dos impactos causados (Bila & Dezotti, 2007).

Nos animais, a função hormonal é muito afetada pela exposição a este tipo de compostos, nomeadamente, o mecanismo de regulação, uma vez que é este que determina as características sexuais e o comportamento das espécies (Américo *et al.*, 2012; Bila & Dezotti, 2007; Nogueira, 1999).

2.1.1. Classes de EDC

Os EDC encontram-se principalmente entre as classes de compostos com origem em produtos ou subprodutos químicos industriais, pesticidas e biocidas, produtos naturais e hormonas sintéticas (IEH, 1995).

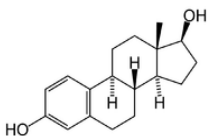
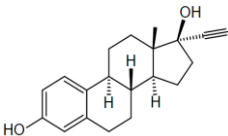
As substâncias classificadas como EDC, incluindo as naturais e sintéticas, podem ser agrupadas em quatro classes distintas (Bila & Dezotti, 2007):

- Substâncias sintéticas utilizadas na agricultura e os seus subprodutos, como pesticidas, herbicidas, fungicidas e moluscicidas;
- Substâncias sintéticas utilizadas nas indústrias e os seus subprodutos, dioxinas, PCB, compostos orgânicos de estanho, retardantes de chama bromados, parabenos, alquilfenóis e os seus subprodutos, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAH), metais pesados, ftalatos e bisfenol A;
- Substâncias naturais, como fitoestrogénios e os estrogénios naturais, estrona (E1), E2 e estriol (E3);
- Compostos farmacêuticos, como o EE2.

2.1.2. Características dos EDC em estudo

Os EDC utilizados neste estudo foram o 17 β -Estradiol (E2) e o 17 α -Etinilestradiol (EE2). Estes compostos são esteróides e apresentam uma estrutura básica de 17 átomos de carbono dispostos em quatro anéis ligados entre si (Campani *et al.*, 2010). O E2 é uma hormona natural e o EE2 uma hormona sintética. A caracterização química destes compostos mostra-se detalhada na **Tabela 2.2**.

Tabela 2.2. Características químicas do E2 e EE2 (adaptado de Reis Filho *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2008).

Composto	E2	EE2
Estrutura		
CAS - nº	50-28-2	57-63-6
Peso Molecular	272,39	296,41
Fórmula Empírica	C ₁₈ H ₂₄ O ₂	C ₂₀ H ₂₄ O ₂
Solubilidade (mg.L ⁻¹)	3,85	19,1
log K _{ow}	4,01	3,67
pK _a	10,23	10,21
K _{oc}	3300	4770

Os estrogénios sintéticos são prescritos, principalmente, como contraceptivos orais, terapias de reposição hormonal, deficiências motoras associadas à menopausa e tratamento dos sintomas associados à pré e pós-menopausa. Os fármacos associados a este tipo de indicações, incluem o E2, EE2 e vários estrogénios conjugados e esterificados (Laurenson *et al.*, 2014).

Os principais metabolitos, dos estrogénios naturais e sintéticos, presentes na urina e fezes incluem o E1, E2, EE2 e E3 (Laurenson *et al.*, 2014). Como resultado da sua utilização e subsequente excreção, os estrogénios em causa são introduzidos no ambiente através de efluentes de ETAR, para rios e lagos, onde os organismos aquáticos ficam expostos a estes compostos. Na **Tabela 2.3** e **Tabela 2.4** mostram-se as concentrações médias e intervalos de concentrações detetadas no ambiente, correspondentes aos compostos E2 e EE2, respetivamente.

Tabela 2.3. Concentrações médias e intervalos de concentrações do E2, detetadas no ambiente (adaptado de Bila & Dezotti, 2007).

EDC	Classe do EDC	Concentração no ambiente (ng.L ⁻¹)	Condições	Local
E2	Estrogénio natural	15	Efluente doméstico	Alemanha
		6	Efluente de ETAR	Canadá
		21	Esgoto doméstico	Brasil
		6 - 9	Água Natural	EUA
		<0,6 - 12	Efluente de ETAR	Países Baixos
		<0,3 - 5,5	Água Superficial	
		<0,5 - 20	Efluente doméstico	Itália e Holanda
		<0,5 - 7	Efluente de ETAR	
		11 - 17	Afluente de ETAR	França
		5 - 9	Efluente de ETAR	
		1 - 3	Água Superficial	
		2,7 - 48	Efluente de ETAR	Inglaterra
		0,5 - 7	Água Superficial	
		1,6 - 7,4	Efluente de ETAR	
		1,1	Efluente doméstico	Suécia
		0,5	Efluente de ETAR	
		5 - 49	Lodo biológico de ETAR	Alemanha
		1,5	Sedimento Marinho	
		0,27 - 2,67	Água Superficial	EUA
		0,48 - 3,66	Efluente de ETAR	
		10 - 31	Afluente de ETAR	Itália
		3 - 8	Efluente de ETAR	
		0,15 - 5,2	Efluente de ETAR	Alemanha
		0,15 - 3,6	Água Superficial	
		0,2 - 2	Água Potável	

Tabela 2.4. Concentrações médias e faixas de concentrações do EE2, detetadas no ambiente (adaptado de Bila & Dezotti, 2007; Barbosa *et al.*, 2016).

EDC	Classe do EDC	Concentração no ambiente (ng.L ⁻¹)	Condições	Local
EE2	Estrogénio sintético	5	Efluente doméstico	Brasil
		1	Efluente de ETAR	Alemanha
		9	Efluente de ETAR	Canadá
		<0,2 - 7,6	Efluente de ETAR	Países Baixos
		<0,1 - 4,3	Água superficial	
		<0,5 - 10	Efluente doméstico	Itália e Holanda
		<0,2 - 2,2	Efluente de ETAR	
		0,2 - 7	Efluente de ETAR	Inglaterra
		5 - 7	Afluente de ETAR	França
		3 - 4,5	Efluente de ETAR	
		1 - 3	Água superficial	Itália
		0,3 - 1,7	Efluente de ETAR	
		4,5	Efluente doméstico	Suécia
		2	Efluente de ETAR	
		2 - 17	Lamas ativadas	Alemanha
		0,25 - 0,52	Água superficial	EUA
		0,24 - 0,76	Efluente de ETAR	
		0,1 - 8,9	Efluente de ETAR	Alemanha
		0,15 - 0,5	Água para consumo	
		22,2 - 29,2	Afluente de ETAR	Espanha
		140	AR antes da decantação primária	EUA
		<4,4 - 7,4	AR	Áustria
		391,4 ± 59,3	AR do tratamento secundário	Portugal

O E2, também pertence à classe dos EDC, e sendo uma hormona natural, é responsável pelo desenvolvimento das características secundárias femininas no início da puberdade. Age no controlo da ovulação, no desenvolvimento do sistema reprodutor, na fertilização e implantação do óvulo e no aumento das glândulas mamárias durante a gravidez (Nassif *et al.*, 2005).

O E2 é o estrogénio de origem natural mais abundante, seguido pela estrona e estriol, que são as suas principais formas de excreção (Américo *et al.*, 2012). Para além do Homem, bovinos e suínos também excretam hormonas naturais (Machado, 2010). A excreção destas hormonas sexuais femininas ocorre diariamente através da urina e em menor proporção pelas fezes. São libertadas continuamente no ambiente, o que lhes concede carácter de persistência (Johnson *et al.*, 2000).

Alguns compostos farmacêuticos, como o EE2, também estão na lista de substâncias classificadas como EDC, uma vez que são hormonas sintéticas usadas como contraceptivos orais, na reposição terapêutica da menopausa ou na prevenção do aborto. No entanto, a maior aplicação médica do EE2 baseia-se nas pílulas contraceptivas, que contém entre 30 a 50 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de EE2 por pílula (Beausse, 2004).

2.1.3. Sistema Endócrino

O sistema endócrino é uma conexão complexa de glândulas, hormonas e recetores, que fornece a chave para a comunicação e controlo entre o sistema nervoso e as funções corporais. Baseia-se em mensageiros químicos, as hormonas que são segregadas no sangue (ou outros fluídos corporais) e podem atingir todas as partes do corpo (ec.europa.eu).

Segundo Reis Filho *et al.* (2006) o sistema endócrino é um mecanismo complexo, formado por combinações de hormonas e glândulas, que coordena e regula a comunicação entre as células, sendo responsável pelas funções biológicas normais, tais como, o desenvolvimento embrionário, o crescimento, o metabolismo e a reprodução. A **Figura 2.1**, mostra o sistema endócrino humano, nomeadamente, as glândulas endócrinas do homem e da mulher.

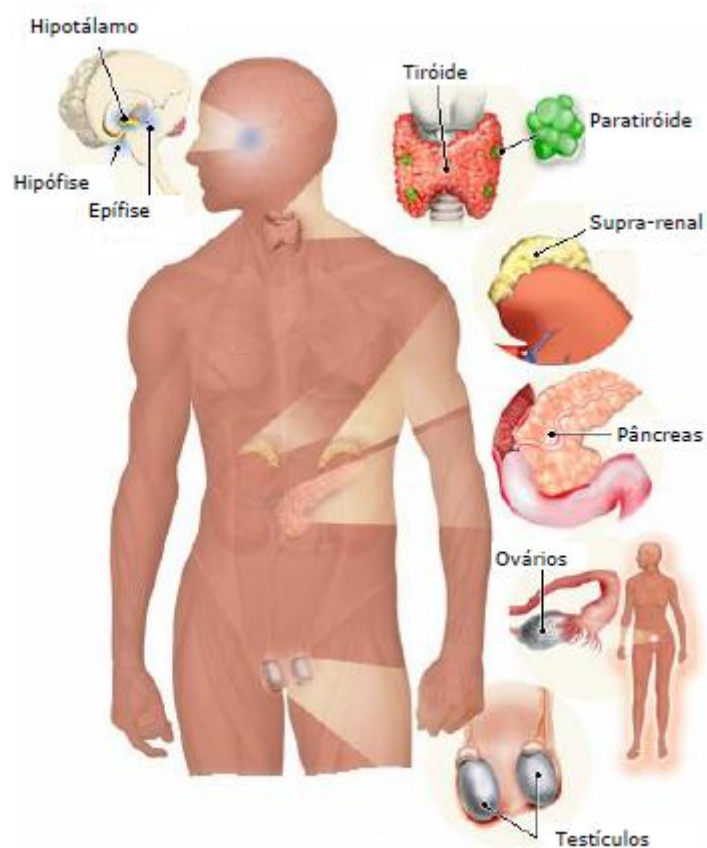


Figura 2.1. sistema endócrino humano, nomeadamente, as glândulas endócrinas do homem e da mulher (adaptado de Henriques, 2008).

O sistema endócrino no Homem, é constituído por três grupos distintos: um conjunto de glândulas especializadas, mensageiros químicos (hormonas) e células alvo. A diversidade de glândulas e de tipos de hormonas é elevada, desempenhando um papel fundamental no crescimento e desenvolvimento, na reprodução e na diferenciação sexual e ainda na formação do sistema nervoso e imunológico (Henriques, 2008).

A alteração da concentração destas substâncias no organismo pode alterar funções e características de órgãos e sistemas, principalmente em períodos críticos do crescimento e de formação dos órgãos e tecidos, nomeadamente durante a fase embrionária e nos primeiros anos de vida do indivíduo (Castro-Correia & Fontoura, 2015).

As hormonas não são exclusivas dos seres humanos. Estão presentes na natureza, tanto em espécies animais como em espécies vegetais. Esta é a razão pela qual, qualquer substância que interfira no mecanismo de ação hormonal pode alterar o desenvolvimento, a reprodução e outras funções dos seres vivos das diversas espécies (Henriques, 2008).

2.1.4. Fontes de EDC e Efeitos nos seres vivos

- **Fontes de EDC:**

A presença de hormonas femininas em águas superficiais, águas subterrâneas, águas residuais e até mesmo águas para consumo humano, têm sido documentadas em diversos países como: Inglaterra, Brasil, Alemanha, Canadá, Itália, Holanda, Estados Unidos da América e Suécia (Américo *et al.*, 2012).

Uma das formas mais comuns de exposição dos organismos com os EDC é através da água contaminada. Os EDC podem contaminar a água de diversas formas (Rosa, 2008):

Fontes pontuais: efluentes de ETAR, efluentes de indústrias, efluentes da atividade agrícola, lixiviados, etc.

Fontes Difusas: infiltração no solo de compostos utilizados na agricultura e indústria, até atingirem os lençóis freáticos, recarga de aquíferos com água contaminada, fossas sépticas, espalhamento de lamas provenientes de ETAR, etc.

A exposição a EDC pode ocorrer através de contacto direto ou indireto. A exposição direta consiste através da alimentação, a exposição indireta consiste, principalmente, nas descargas de efluentes de ETAR (Duarte, 2008; Ternes *et al.*, 1999).

As excreções por parte das mulheres que ingerem a pílula contraceptiva, representam a principal fonte de EE2 no ambiente. Cerca de 20 a 48% da dose diária de EE2 presente na pílula é metabolizada pelo corpo, a restante percentagem é excretada na sua forma original ou como metabolitos, sulfatos ou glucoronidos conjugados. Quando estes metabolitos atingem os

sistemas de tratamentos de águas residuais, maioritariamente, voltam à sua forma livre ficando dessa forma disponíveis no ambiente (Wise *et al.*, 2011).

A **Figura 2.2** mostra a contribuição estimada da excreção total de estrogénios naturais (E1, E2 e E3) e do estrogénio sintético EE2. Na **Tabela 2.5**, encontram-se os valores da excreção diária *per capita* de estrogénios, em µg.

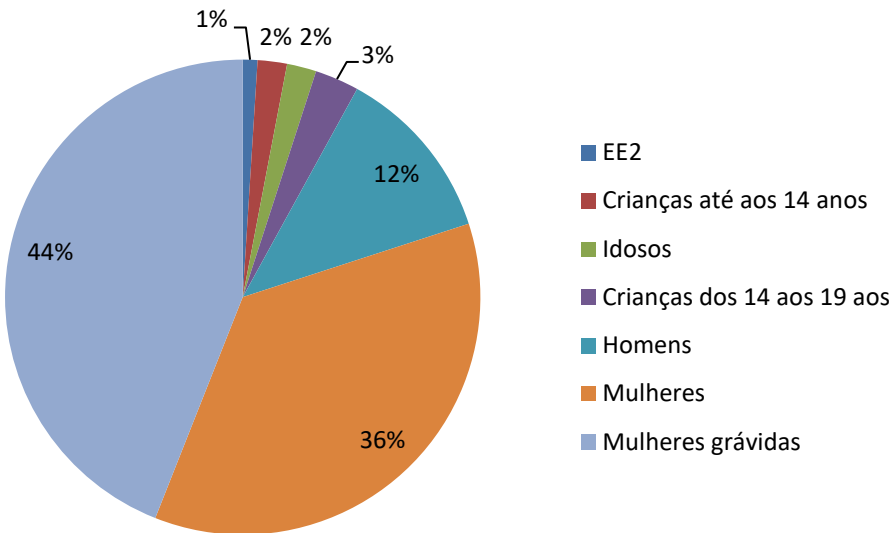


Figura 2.2. Contribuição estimada da excreção total de estrogénios naturais (E1, E2 e E3) e do estrogénio sintético EE2 (Wise *et al.*, 2011).

Tabela 2.5. Excreção diária *per capita* de estrogénio, em µg (adaptado de Reis Filho *et al.*, 2006; Bila & Dezotti, 2007; Campani *et al.*, 2010).

Categoria	E1	E2	E3	EE2
Mulheres em período fértil	8	3,5	4,8	3,5
Mulheres na menopausa	4	2,3	1	-
Mulheres grávidas	600	259	6000	-
Homens	39	1,6	1,5	-

Para além do Homem, existem outros animais responsáveis pela presença de estrogénios no meio ambiente. A quantidade de estrogénios libertados por animais varia consoante a espécie em causa e o tipo produção. Alguns investigadores relataram a presença de E2 (de 6 a 66 ng.L⁻¹) em águas subterrâneas próximas a áreas com alta densidade de criação de animais. Os estrogénios são naturalmente excretados ou são administrados como estimulante da fertilização (Bila & Dezotti, 2007; Henriques, 2008).

Na **Tabela 2.6** encontram-se detalhadas as excreções diárias de estrogénio total, estimadas por diferentes espécies de animais.

Tabela 2.6. Excreções diárias de estrogénio total estimadas por diferentes espécies de animais (adaptado de Wise *et al.*, 2011).

Gado	Espécie	Total de estrogénios excretados pela urina ($\mu\text{g}.\text{dia}^{-1}$)	Total de estrogénios excretados pelas fezes ($\mu\text{g}.\text{dia}^{-1}$)	Total de estrogénios excretados por dia (μg)	Cabeças de gado, EUA (milhões)
Bovino	Bezerros	15	30	45	17
	Vacas	99	200	299	20
	Prenhes	320 - 104 320	256 - 7 300	576 - 111 620	43
Suíno	Porcos	82	21	103	-
	Prenhes	700 - 17 000	61	761 - 17 061	-
Ovino	Ovelhas	3	20	23	2,5
	Carneiros	3	22	25	0,6

- **Efeitos dos EDC nos animais:**

Os peixes expostos a efluentes de águas residuais podem bioacumular uma mistura complexa de químicos estrogénicos, associados a uma variedade de estrogénios sintéticos e naturais presentes nos resíduos humanos, assim como outros compostos, tais como os alquilfenóis, resultantes das descargas industriais. A exposição a curto prazo pode induzir respostas de feminização em peixes, que incluem o aumento dos genes dependentes de estrogénio e de vitelogenina (VTG) (Flores-Valverde *et al.*, 2010).

Os efeitos nocivos dos EDC presentes no ambiente têm sido alvo de estudos, muitos deles relacionam esta problemática com a alteração do comportamento e reprodução de algumas espécies de animais. Este problema não é isolado e atualmente existem populações de animais que estão em risco (Colborn *et al.*, 1993). Na **Tabela 2.7** mostram-se alguns efeitos dos EDC nos seres vivos.

Tabela 2.7. Alguns efeitos dos EDC associados aos seres vivos
(Américo *et al.*, 2012; Colborn *et al.*, 1993).

Efeitos dos EDC	Animais afetados
Anomalia no funcionamento da tireóide	Aves
	Peixes
Diminuição da fertilidade	Aves
	Peixes
	Mamíferos (Ratos)
Problemas no período de incubação	Peixes
	Aves
	Répteis (Tartarugas)
Feminização de machos	Peixes
	Aves
	Mamíferos
Masculinização de fêmeas	Peixes
	Aves
Alterações na função imunológica	Aves
	Mamíferos
Anomalias no sistema reprodutivo	Peixes
	Répteis
	Aves
	Anfíbios
Indução da síntese de VTG no plasma	Peixes
	Répteis (Tartarugas)
Alterações na produção de ovos	Répteis (Tartarugas)
Hermafroditismo	Peixes
Efeitos adversos na funcionalidade dos ovários	Mamíferos (Ratos)
Anomalias nos embriões	Aves

A proteína VTG desempenha um papel importante no sistema reprodutivo dos vertebrados ovíparos, sendo sintetizada no fígado, regulada pelo estrogênio e transportada pelo sangue para os ovários, onde é incorporada no desenvolvimento dos óvulos (Panter *et al.*, 1998; Irwin *et al.*, 2001). O gene da VTG também está presente nos machos mas em condições normais não se manifesta, possivelmente, devido à baixa concentração de estrogênio no sangue (Schmid *et al.*, 2002).

Quando os peixes machos são expostos a substâncias estrogênicas são capazes de produzir grandes quantidades de VTG e começam a desenvolver algumas características idênticas às fêmeas (Américo *et al.*, 2012). Segundo Schmid *et al.* (2002) níveis altos de VTG no plasma podem ainda provocar a morte de peixes.

Os principais estudos sobre os efeitos dos EDC em animais estão relacionados com problemas ao nível do sistema reprodutor, afetando diretamente a reprodução e a produção de hormonas o que, a longo prazo, pode levar à extinção de algumas espécies com um ciclo de vida curto (Américo *et al.*, 2012).

- **Efeitos dos EDC nos Humanos:**

Durante as últimas duas décadas foi registado um aumento anormal de desregulações patológicas principalmente no sistema reprodutivo masculino, nomeadamente, diminuição da quantidade e qualidade do esperma, cancro dos testículos e próstata (Toppari *et al.*, 1995). Recentemente foi sugerido que estas anomalias registadas resultavam da exposição à poluição por compostos antropogénicos que possuem características desreguladoras endócrinas (Colborn *et al.*, 1993; Toppari *et al.*, 1995).

Apesar de alguns autores referirem que não há uma evidente relação entre a exposição aos EDC e danos na saúde de humanos há, no entanto, claras evidências experimentais e epidemiológicas do papel desses compostos na disfunção do sistema reprodutivo humano (Américo *et al.*, 2012).

Alguns EDC bioacumulam-se no tecido adiposo dos animais e humanos, alcançando níveis que podem ser mais altos do que os presentes no ambiente. Por vezes levam um longo período para se degradarem, permanecendo no corpo por vários anos e em níveis mais elevados do que as hormonas naturais (Bila & Dezotti, 2007).

A exposição a estrogénios sintéticos em mulheres, é o principal fator de risco para o desenvolvimento de cancro da mama e do útero. A exposição de homens adultos a estrogénios, tem como efeitos a ginecomastia (crescimento das mamas) e interfere no funcionamento do sistema glandular resultando em impotência, redução na produção de espermatozóides (Américo *et al.*, 2012; Bila & Dezotti, 2007).

Outro aspeto importante, são os efeitos nos grupos de risco (crianças, idosos, mulheres grávidas etc.) onde doses extremamente baixas podem provocar danos significativos, mais concretamente, efeitos ao nível do sistema reprodutor nos adultos e problemas de desenvolvimento em recém-nascidos, provocados por determinados metais pesados (ex. chumbo e mercúrio), pesticidas (ex. DDT), químicos utilizados em processos industriais (ex. PCB), solventes e outras substâncias (Foster, 1998).

2.1.5. Enquadramento Legal

Múltiplas organizações governamentais e não-governamentais, como a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (US EPA), a União Europeia (EU), o Programa Internacional de Segurança Química (IPCS), a Organização Mundial da Saúde (OMS), entre outros, têm vindo a desenvolver planos e programas de pesquisa sobre a problemática dos

EDC (Bila & Dezotti, 2007; Bolong *et al.*, 2009; Fernandes, 2016; Reis Filho *et al.*, 2006). Na **Tabela 2.8**, mostra-se um resumo histórico de alguns seminários, comitês e relatórios de avaliação sobre EDC.

Tabela 2.8. Resumo histórico de alguns seminários, comitês e relatórios de avaliação sobre os EDC (adaptado de Bila & Dezotti, 2007).

Ano	Organização	Objetivos de Estudo
1995	Agência Federal Alemã	Discussão sobre a ocorrência e impacto dos EDC e potenciais riscos que podem causar aos humanos e outros animais.
	US EPA	Seminário para avaliar os riscos para a saúde e efeitos ambientais dos EDC.
	Ministério do meio ambiente e energia da Dinamarca	Avaliação dos efeitos de substâncias estrogênicas no desenvolvimento e nas funções do sistema reprodutivo masculino.
1996	US EPA	Seminário para desenvolvimento de estratégias para avaliar o risco dos EDC ao meio ambiente.
		Desenvolvimento de programas de testes e análises “screening” para avaliar a ação dos EDC.
1997		Relatório sobre os EDC presentes no meio ambiente.
1998		Revisão e discussão das informações científicas disponíveis sobre os EDC.
	OECD	Desenvolvimento de métodos de ensaio para os EDC.
1999	CSTEE	Revisão da literatura existente e opinião científica nas evidências dos EDC, em particular, avaliação dos riscos ecológicos e diretrizes de ensaios toxicológicos.
	Comissão das Comunidades Europeias	Identificação dos problemas dos EDC, suas causas, consequências e definição das medidas adequadas para dar uma resposta ao problema.
2001		Primeiro relatório sobre o progresso dos trabalhos da comunidade europeia sobre os EDC
		Programa COMPREHEND: Avaliação das evidências dos EDC no ambiente aquático na Europa.
2002	OECD	Avaliação dos métodos de ensaio para as substâncias estrogênicas.
	OMS	Avaliação global do estado da arte da ciência dos EDC.
2003	IEH	Relatório de avaliação do progresso internacional da pesquisa dos EDC.
2004	Comissão das Comunidades Europeias	Segundo relatório sobre o progresso dos trabalhos sobre os EDC.

A Diretiva 2000/60/CE de 23 de Outubro, ou Diretiva Quadro da Água, estabelece um quadro de ação comunitária no domínio da política da água, no entanto, não faz qualquer tipo de referência aos EDC. Contudo, a Diretiva 2008/105/CE, no ponto 4º do artigo 16º, referiu que de quatro em quatro anos, a Comissão Europeia tem que rever a lista de substâncias prioritárias referidas no anexo X da mesma (Gaffney *et al.*, 2014).

Foi elaborada uma proposta para uma nova Diretiva, a 31 de Janeiro de 2012, que pretende alterar a Diretiva Quadro da Água e a Diretiva 2008/105/CE no que diz respeito às substâncias prioritárias no domínio da política da água. Os EDC em estudo, E2 e EE2, já são referidos nesta nova diretiva, onde estabelece normas de qualidade ambiental em valores médios anuais de $4 \times 10^{-4} \mu\text{g.L}^{-1}$ e $3,5 \times 10^{-5} \mu\text{g.L}^{-1}$ em águas de superfície interiores e $8 \times 10^{-5} \mu\text{g.L}^{-1}$ e $7 \times 10^{-6} \mu\text{g.L}^{-1}$ para os restantes tipos de águas superficiais para o E2 e EE2, respetivamente (Gaffney et al., 2014).

2.2. Sistemas de Tratamento de Águas Residuais

Diversos estudos mostram que os sistemas de tratamento de águas residuais removem EDC, no entanto, os processos usados apresentam eficiências de remoção muito variáveis, consoante a natureza e composição da água. Geralmente, os EDC podem ser removidos de uma AR através de quatro vias (Rosa, 2008):

- Adsorção aos sólidos suspensos e, ou gorduras e óleos presentes na AR;
- Biodegradação aeróbia ou anaeróbia;
- Degradação química;
- Volatilização.

O tratamento convencional de uma ETAR é constituído, normalmente, por três estágios: tratamento preliminar, tratamento primário e tratamento secundário. Nos casos em que o efluente tratado é descarregado para massas de água superficiais, é habitual existir o tratamento terciário (Koh *et al.*, 2008). Este tipo de tratamento fornece o melhor modelo para estudar os mecanismos onde os estrogénios naturais são atenuados. Geralmente acredita-se que a transformação e a biodegradação são os processos principais na remoção de estrogénios de águas residuais, no entanto, a adsorção também representa um papel significativo na remoção deste tipo de compostos (Koh *et al.*, 2008). Na **Tabela 2.9** apresentam-se alguns processos de tratamento associados à remoção de EDC.

Tabela 2.9. Processos de tratamento associados à remoção de EDC (adaptado de Bolong *et al.*, 2009).

Processo de Tratamento	Eficiência de Remoção	Observações
Coagulação com recurso a alúmen (sulfato duplo de alumínio e potássio) ou sulfato de ferro	<20%	Especialmente por associação à matéria particulada
Adição de cal	<20%	pH entre 9 e 11
Carvão ativado em pó (PAC)	>90%	Tempo de contacto de 4 horas
Biofilme	-	Depende da biodegradabilidade dos compostos As eficiências de remoção não são claras
Adição de cloro	>90%	Quanto mais reativo for o composto e apresentar um anel aromático com o grupo funcional composto por hidróxidos, melhor a eficiência de remoção Processo não aconselhável porque produz produtos clorados que reagem com os EDC
Ozonização	-	A taxa de remoção aumenta ao adicionar peróxido de hidrogénio durante a ozonização Funciona de forma semelhante ao tratamento com cloro

2.2.1. Tratamento Preliminar

O tratamento preliminar corresponde à primeira etapa do tratamento da água residual numa ETAR e tem como objetivo proteger o sistema de tratamento. Normalmente é constituído por uma gradagem, onde ocorre a separação de óleos e gorduras (flotação) e a remoção de sólidos de maiores dimensões. Nesta fase do tratamento, a remoção de EDC é muito reduzida ou insignificante (Koh *et al.*, 2008; Rosa, 2008).

2.2.2. Tratamento Primário

No tratamento primário, a remoção de EDC realiza-se maioritariamente através da adsorção aos sólidos, que sedimentam no fundo do decantador (lamas primárias) (Rosa, 2008). Desta forma, a quantidade de EDC removida ao longo desta etapa depende (Koh *et al.*, 2008):

- Em grande parte, da hidrofobicidade das hormonas;
- Teor de sólidos suspensos e da sua sedimentação;
- Tempo de retenção;
- Carga hidráulica.

A remoção destes compostos também pode ser afetada pela temperatura, quanto menor a temperatura maior a remoção de EDC (Rosa, 2008).

2.2.3. Tratamento Secundário

O tratamento secundário ou biológico, pode envolver processos de biodegradação anaeróbios, apesar dos processos mais comuns nas ETAR serem os de biodegradação aeróbios. Os processos aeróbios baseiam-se no contacto entre bactérias aeróbias e outros microrganismos com a AR, em contacto com oxigénio, convertendo os compostos orgânicos em biomassa, dióxido de carbono e água (Rosa, 2008). Dividem-se em sistemas de biomassa suspensa, como é o caso das lamas ativadas, e em sistemas de biomassa fixa, nomeadamente, discos biológicos e leitos percoladores.

Tem sido demonstrado que o tratamento secundário é o processo chave da remoção da maioria dos estrogénios, numa ETAR. A biodegradação desempenha um papel bastante significativo na remoção deste tipo de hormonas, uma vez que, alguns dos microrganismos presentes no tratamento biológico possuem a capacidade de utilizar micropoluentes como fontes de carbono para o seu metabolismo (Koh *et al.*, 2008).

A remoção de EDC nesta fase inclui processos de degradação biológica e química, processos de adsorção aos flocos microbiológicos e consequente remoção nas lamas secundárias, bem como processos de transformação e volatilização durante o arejamento (Hamid & Eskicioglu, 2012; Koh *et al.*, 2008; Rosa, 2008).

Na **Tabela 2.10**, observam-se alguns dos processos de tratamento, operações unitárias e condições físicas essenciais que contribuem para a remoção de EDC (Ahel *et al.*, 1994; Huang & Sedlak, 2001; Morris & Lester, 1994; Rosa, 2008).

Tabela 2.10. Percentagens de remoção de alguns EDC e respetivos processos de tratamento.

EDC	Processo de Tratamento	Eficiência de Remoção	Observações
PCB	Biofiltração	90%	
	Lamas Ativadas	96%	
	Biofiltração + Lamas Ativadas	99%	
Nonilfenol (NP)	Lamas Ativadas (alta carga) sem nitrificação	37%	
	Lamas Ativadas (baixa carga) com nitrificação	77%	
Nonilfenol polietoxilato (NP ₁ EO)	Lamas Ativadas (alta carga) sem nitrificação	-3%	(produzido como produto da degradação do NP)
	Lamas Ativadas (baixa carga) com nitrificação	31%	
Nonilfenol polietoxilato (NP ₂ EO)	Lamas Ativadas (alta carga) sem nitrificação	-5%	(produzido como produto da degradação do NP)
	Lamas Ativadas (baixa carga) com nitrificação	91%	
Nonilfenol polietoxilato (NP ₆ EO)	Lamas Ativadas (alta carga) sem nitrificação	78%	
	Lamas Ativadas (baixa carga) com nitrificação	98%	
E2 e EE2	Filtração com areia	70%	
	Microfiltração + Osmose inversa	95%	

2.2.4. Tratamento Terciário

A otimização dos processos utilizados nas ETAR é imprescindível para diminuir as quantidades de fármacos nos efluentes. Aumentar o tempo de retenção das lamas, utilizar bioreatores de membrana e processos avançados de oxidação, são algumas opções de tratamento que tendem a reduzir os níveis de fármacos nos efluentes mas que não são muito utilizadas por serem bastante dispendiosas (Roque, 2009).

Algumas das operações unitárias que constituem o tratamento terciário, aumentam significativamente a remoção de EDC em ETAR. Desta forma, este estudo pretende analisar a viabilidade da implementação de um reator de discos biológicos em ETAR, como tratamento terciário, com vista a aumentar a eficiência de remoção de fármacos como o E2 e EE2.

2.2.4.1. Reatores de Discos Biológicos

Os reatores de discos biológicos (RDC) são um tratamento biológico de biomassa fixa para biodegradação de efluentes. Estes sistemas fornecem um meio de suporte para o crescimento do biofilme. Podem ser arejados devido ao contacto direto do biofilme com o ar durante a rotação, ou com ambiente mais controlado criando condições de anoxia. A sua fase líquida é homogénea, requerendo, por isso, pouca manutenção (Vasiliadou *et al.*, 2014).

Ao colocar vários conjuntos de discos em série, é possível obter uma eficiência de tratamento superior. As principais vantagens deste processo são a simplicidade da operação e custos de energia relativamente baixos, quando comparados com sistemas de biomassa suspensa (Davis, 2010).

Uma unidade de discos biológicos consiste num conjunto de discos circulares (3 a 3,5 m de diâmetro), de poliestireno ou polivinil clorídrico, pouco espaçados entre si, fixados a um eixo horizontal que roda sobre si. Ficam parcialmente submersos, normalmente cerca de 40%, num tanque com a água residual (Metcalf & Eddy, 2003), **Figura 2.3**.

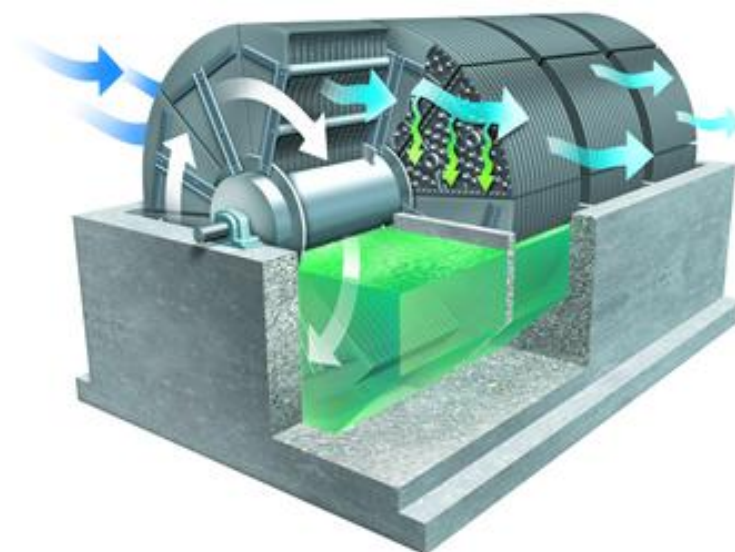


Figura 2.3. Reator de discos biológicos (www.walker-process.com/prod_bio_RBC.htm).

A rotação dos discos pode ser garantida por força mecânica, associada a um motor, ou eólica, com a instalação de umas pás na periferia de cada disco, a rotação inicia-se com a força do vento (Metcalf & Eddy, 2003). Quando o processo de RBC entra em funcionamento, os microrganismos aderem às superfícies em rotação e vão crescendo até que toda área de superfície dos discos seja coberta. (Davis, 2010; Metcalf & Eddy, 2003).

2.2.4.2. Biofilme

Um biofilme bem desenvolvido desempenha um papel fundamental no tratamento biológico de AR, uma vez que uma concentração elevada de biomassa permite tratar igualmente maiores cargas volúmicas, contribuindo assim para uma melhor qualidade do efluente. Tem um baixo consumo de energia e a sua manutenção não requer processos de separação ou reciclagem de lamas (Sarkar & Mazumder, 2015).

Um biofilme é um conjunto de microrganismos, principalmente bactérias, que aderem a uma dada superfície num ambiente aquoso. Na realidade, a formação do biofilme pode

acontecer em qualquer superfície que esteja em contacto com bactérias e com um meio líquido (Characklis & Marshall, 1989). Na **Figura 2.4**, mostra-se um reator de discos biológicos com presença de biofilme, utilizado no presente estudo.



Figura 2.4. Reator de discos biológicos com biofilme desenvolvido, utilizado no presente estudo (Fotografia da Autora).

Um biofilme pode ser constituído por uma ou várias espécies de bactérias, incluindo, fungos, protozoários e algas. Os seus principais componentes são os microrganismos, os seus produtos de excreção e água (Allison, 2003). A água é o principal constituinte, representa cerca de 80 a 95% da sua composição e os microrganismos representam uma fração inferior a 10%. Os produtos de excreção representam entre 70 a 95% da matéria orgânica seca do biofilme (Machado, 2005).

Após a sua formação, podem desencadear-se uma série de reações microbiológicas no biofilme, benéficas ou não (tendo em consideração aspetos relacionados com a saúde humana), dependendo das condições ambientais envolventes (Rodrigues, 2009). A formação do biofilme, **Figura 2.5**, passa por três etapas: o contacto das células com a superfície, o crescimento e colonização, e o desprendimento.

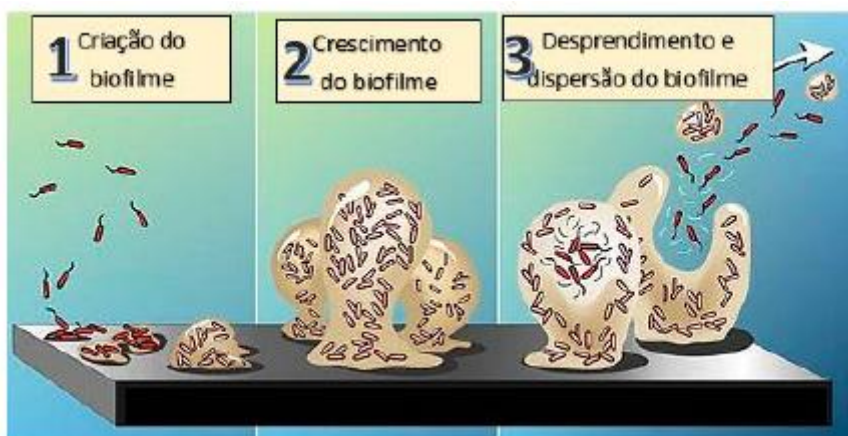


Figura 2.5. Etapas de formação de um biofilme (adaptado de *Center for Biofilm Engineering*).

2.3. Métodos analíticos e Técnicas de quantificação de EDC

2.3.1. Extração Sortiva em Barra de Agitação (SBSE)

Existe uma procura crescente por novos métodos analíticos sensíveis, fiáveis e economicamente mais sustentáveis, para um elevado número de compostos. Devido aos baixos níveis de concentrações presentes, a maioria dos métodos baseia-se em técnicas de pré-concentração que precedem a análise. Na última década, o uso de técnicas como a extração sortiva em barra de agitação (SBSE) ou microextração em fase sólida (SPME), aumentou consideravelmente (Pintado-Herrera *et al.*, 2014).

Nos últimos anos, a SBSE tornou-se numa técnica analítica bem estabelecida no âmbito da preparação de amostras, uma vez que, apresenta um desempenho notável na análise de sistemas complexos, combina a microextração e a concentração dos analitos em simultâneo. É uma técnica de sorção muito eficiente indicada para análise vestigial de compostos alvo, com características hidrofóbicas até polaridade intermédia, fundamentalmente em matrizes aquosas (Nogueira, 2012). Na **Tabela 2.11** estão descritas as principais vantagens e limitações da extração por SBSE.

Tabela 2.11. Vantagens e limitações associadas à técnica SBSE (Nogueira, 2012).

Técnica SBSE	
Vantagens	Limitações
Podem ser reutilizadas centenas de vezes.	Demonstra alguma ineficácia com compostos polares.
Apresenta um elevado nível de sensibilidade.	Dificuldades em análises com diversos compostos em simultâneo, devido à diversidade de compostos e propriedades físico-químicas.
Diminui os limites de deteção.	É muito sensível a velocidades de agitação muito elevadas.
Reduz a manipulação e o tempo requerido no preparo das amostras.	Volumes de amostra muito grandes, decrescem a eficiência de extração.

Na **Figura 2.6 a**, mostra-se um esquema da constituição dos dispositivos analíticos da técnica SBSE, as barras de agitação magnética são incorporadas dentro de tubos de vidro selados e revestidos no exterior com uma camisa, contendo entre 24 e 126 μL em polidimetilsiloxano (PDMS). Esta fase apresenta propriedades apolares que impulsionam interações hidrofóbicas com os analitos alvo e o polímero permite operar numa vasta gama de temperaturas, devido às suas propriedades de difusão e termoestabilidade (Nogueira, 2012).

O princípio da técnica SBSE consiste em dois passos essenciais, a extração ou enriquecimento dos analitos da amostra para o PDMS e a retroextração, ou dessorção, dos

mesmos da fase polimérica para o sistema cromatográfico. A **Figura 2.6 b**, mostra os modos de operação relativos à extração e a **Figura 2.6 c**, os modos de retroextração utilizados na técnica de SBSE (Nogueira, 2012).

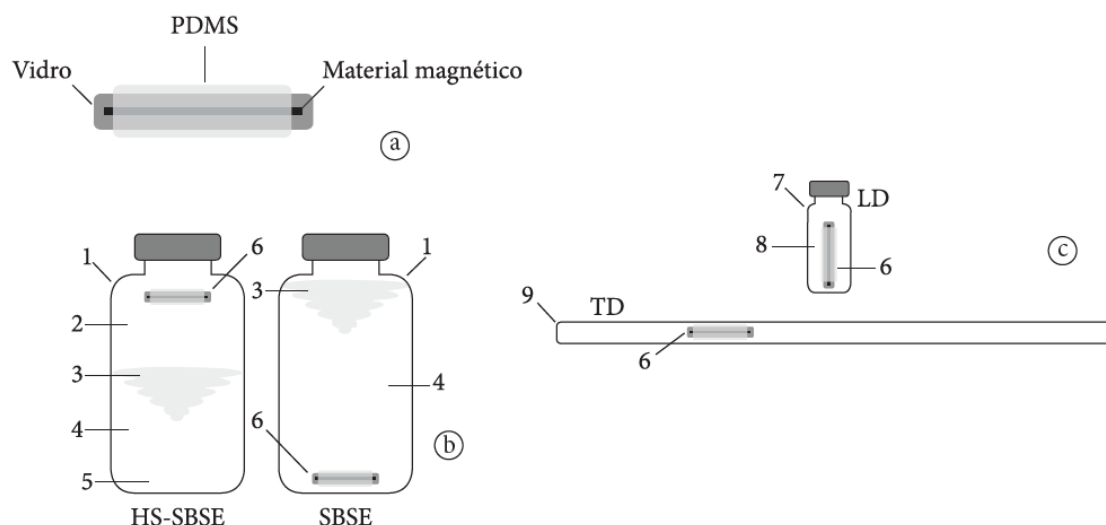


Figura 2.6. Representação esquemática da constituição da barra de agitação (a), dos modos de operação relativos à extração (b) e à retroextração (c), utilizados na técnica de SBSE (adaptado de Nogueira, 2012). 1- Frasco de amostragem; 2- HS; 3- Vortex; 4- Amostra; 5- Barra de agitação magnética em *Teflon*; 6- Barra de agitação de SBSE; 7- *Vial*; 8- Solvente para a dessorção líquida (LD); 9- Tubo de vidro para a dessorção térmica (TD).

A capacidade de retenção do composto alvo ao PDMS não é influenciada pela presença de interferentes da matriz. A SBSE é controlada pelo coeficiente de partição de solutos entre a fase do PDMS e a fase aquosa (Baltussen *et al.*, 1999; Queiroz, 2009). Relativamente ao coeficiente de partição octanol-água ($\log K_{ow}$) é possível afirmar que quanto maior for o grau de hidrofobicidade dos analitos alvo, maior será a eficiência de extração por SBSE (Nogueira, 2012).

Podem existir variáveis que influenciam o processo de extração, nomeadamente, o volume da amostra, o tempo de equilíbrio e a velocidade de agitação, o ajustamento do pH, a polaridade e também a força iônica da matriz. A SBSE opera à temperatura ambiente, principalmente quando o modo de amostragem ocorre por imersão (Nogueira, 2012).

Durante a preparação da amostra, a adição de um eletrólito favorece a migração dos solutos para a fase polimérica, efeito *salting-out*. Desta forma, a adição de um sal aumenta a recuperação dos compostos, forçando-os a migrarem para a fase de PDMS, melhorando a eficiência de extração (Nogueira, 2012; Pintado-Herrera *et al.*, 2014).

No sentido de minimizar a adsorção dos analitos às paredes de vidro dos *vials*, recomenda-se a utilização de álcoois, como é o caso do metanol, para modificar a polaridade da matriz durante o processo de extração (Nogueira, 2012; Pintado-Herrera *et al.*, 2014).

2.3.2. Cromatografia Líquida de Alta Resolução (HPLC-DAD)

Existem dois grandes grupos de técnicas cromatográficas: a cromatografia gás-líquido (GC) e a cromatografia líquido-líquido (LC). Estas técnicas são adequadas para separar elementos simples de amostras complexas (Rangel, 2010). Neste estudo, a técnica utilizada denomina-se por Cromatografia líquida de alta resolução (HPLC), com detetor de Fotodíodos (DAD), em coluna de fase reversa (C18). A **Figura 2.7** ilustra o equipamento de HPLC utilizado neste estudo.



Figura 2.7. Equipamento HPLC-DAD utilizado neste estudo (Fotografias da Autora). 1- Eluentes; 2- Detetor de Fotodíodos; 3- Coluna cromatográfica.

A técnica de HPLC é muito utilizada na determinação de compostos com concentrações vestigiais numa determinada amostra. Apresenta vantagens ao nível da rapidez dos resultados, no poder de resolução e na deteção de compostos com concentrações vestigiais. Esta técnica divide-se em duas fases: uma fase estacionária, enchimento da coluna cromatográfica, e uma fase móvel, eluente que percorre a coluna cromatográfica. Normalmente, a separação dos compostos ocorre em fase reversa, em que a fase estacionária é apolar e a fase móvel polar (Rangel, 2010; Silva, 2007).

São usadas colunas cromatográficas equipadas com materiais apolares, como géis de sílica modificados com grupos alquila e percorridas por uma fase móvel líquida polar. Os compostos são separados através da migração destes na coluna, porém, o nível de definição depende da fase estacionária. A afinidade que a fase estacionária tem pelos diferentes compostos permite um arrastamento destes ao longo da coluna a diferentes velocidades, obtendo-se uma melhor leitura (Rangel, 2010).

2.4. Caracterização da ETAR de Fernão Ferro

A água residual utilizada durante este trabalho foi recolhida na ETAR de Fernão Ferro. Esta ETAR encontra-se em funcionamento desde 1988 e localiza-se no concelho de Seixal, freguesia de Fernão Ferro (Russo, 2011). É explorada pela empresa Águas de Lisboa e Vale do Tejo (ALVT) e tem capacidade para efetuar o tratamento de $5\,890\text{ m}^3\cdot\text{dia}^{-1}$ de águas residuais urbanas, para o ano horizonte de projeto, que corresponde a cerca de 32 700 habitantes equivalentes (ARHT, 2011). Na **Figura 2.8** observa-se a vista aérea da ETAR em questão.



Figura 2.8. Vista aérea da ETAR de Fernão Ferro

(<https://www.flickr.com/photos/cmseixal/5247067674/in/photostream/>).

O tratamento da fase líquida desta ETAR é composto por duas linhas em paralelo e a sequência de tratamento está detalhada na **Figura 2.9**. É importante referir que a água residual foi recolhida a jusante da decantação secundária e a montante da desinfecção por UV, isto é, logo após a decantação secundária.

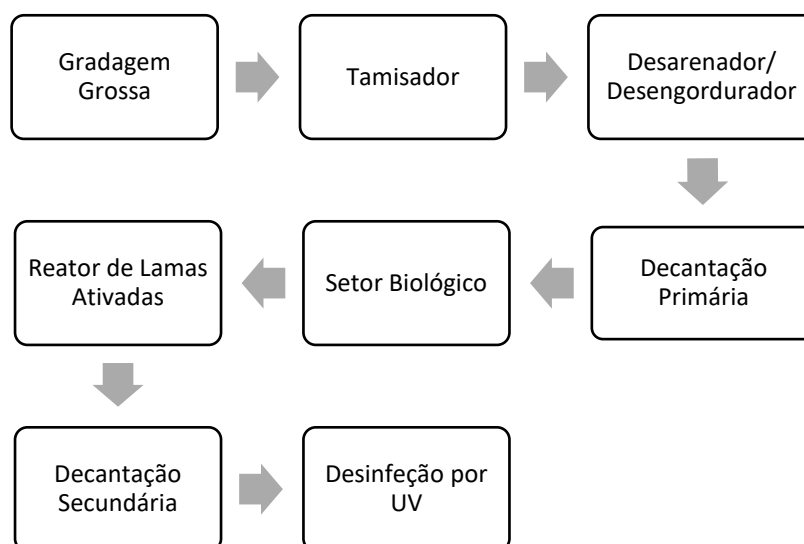


Figura 2.9. Sequência de tratamento da ETAR de Fernão Ferro (adaptado de Saraiva, 2015).

2.4.1. Características da água residual

Segundo a ALVT, durante o ano de 2016 o caudal médio tratado na ETAR de Fernão Ferro foi de 1 100 m³.dia⁻¹. Na **Tabela 2.12** são apresentadas as características quantitativas e qualitativas do afluente da ETAR e os respetivos requisitos de qualidade do efluente tratado.

Tabela 2.12. Características quantitativas e qualitativas médias atuais do afluente e os requisitos de qualidade do efluente tratado na ETAR de Fernão Ferro (ALVT, 2016).

	Parâmetro	Concentração	Unidade
Afluente	Caudal médio	1100	m ³ .dia ⁻¹
	CBO ₅	150	mg.L ⁻¹
	CQO	322	mg.L ⁻¹
	SST	119	mg.L ⁻¹
	Coliformes fecais	<2000	NMP.100 mL ⁻¹
Efluente	CBO ₅	25	mg.L ⁻¹
	CQO	125	mg.L ⁻¹
	SST	35	mg.L ⁻¹
	Coliformes fecais	1000	NMP.100 mL ⁻¹

3. Plano Experimental

Com o objetivo de estudar a eficiência de remoção de E2 e EE2 em águas residuais urbanas com recurso a discos biológicos foram realizados ensaios numa instalação piloto à escala laboratorial.

Neste estudo, a água residual utilizada passou previamente por um tratamento secundário numa ETAR, isto é, o estudo teve por base uma água residual urbana real tratada.

As condições da solução de alimentação que se pretenderam simular incluem valores característicos de um efluente secundário, isto é, por exemplo, em termos de CQO de 125 mgO₂.L⁻¹.

A **Tabela 3.1** apresenta o plano experimental do presente trabalho e a **Tabela 3.2** resume as condições do mesmo.

Tabela 3.1. Plano experimental do presente trabalho.

Fase	Descrição
1	Estudo do desenvolvimento do biofilme com AR tratada proveniente de uma ETAR
2	Métodos analíticos auxiliares aos ensaios
3	Estudo da remoção de E2 com recurso à extração por SBSE
4	Estudo da remoção de E2 e EE2, em simultâneo, com recurso à extração por SBSE

Tabela 3.2. Resumo das condições iniciais dos ensaios realizados.

Ensaio	Fármaco	S ₀ (µg.L ⁻¹)	CQO (mg O ₂ .L ⁻¹)	Caudal (L.h ⁻¹)
1	E2	100	125	0,5
2	E2 e EE2			

S₀ – Concentração do fármaco injetado diariamente na alimentação (AR).

4. Materiais e Métodos

4.1. Materiais

Para a realização dos ensaios utilizou-se uma instalação piloto de discos biológicos, especialmente desenvolvida para este tipo de ensaios. A **Tabela 4.1** mostra as principais características desta instalação piloto.

Nas **Figura 4.1** e **Figura 4.2** mostra-se um diagrama da instalação piloto e uma fotografia da mesma, respetivamente. Na **Figura 4.3** é possível visualizar a instalação piloto de discos biológicos mais pormenorizada.

O equipamento associado ao funcionamento da instalação piloto era composto por:

- Um reservatório de armazenamento da solução de alimentação com uma capacidade de 25 L, instalado num frigorífico com uma refrigeração de aproximadamente de 4°C;
- Um reservatório para recolha do efluente do reator, também com uma capacidade de 25 L;
- Uma bomba peristáltica de débito variável, marca *Lead Fluid*, tipo YZ15.

Tabela 4.1. Características da instalação piloto de discos biológicos.

Número de reatores	1
Volume unitário (L)	0.9
Número de discos por reator	4
Diâmetro dos discos (m)	0.12
Velocidade de rotação dos discos (rpm)	10
Motor-redutor de acionamento dos discos	Marca: <i>Oriental Motor</i> (Japão) 5IK60GS-CFE

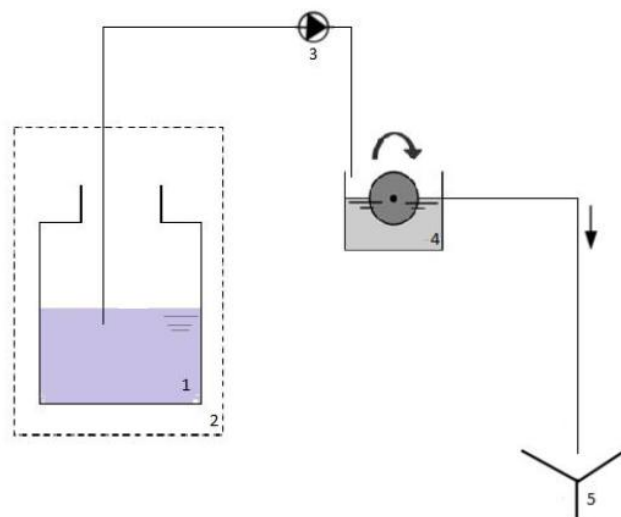


Figura 4.1. Esquema da instalação piloto utilizada no plano experimental (adaptado de Fernandes, 2016; Vicente, 2016). 1- Reservatório que armazena a alimentação (água residual), 2- Frigorífico, 3- Bomba Peristáltica, 4- Reator de Discos Biológicos, 5- Reservatório de descarga.



Figura 4.2. Instalação piloto utilizada no plano experimental (Fotografia da autora). 1- Frigorífico com a alimentação, 2- Reator de discos biológicos, 3- Bomba peristáltica, 4- Reservatório de descarga de efluente.

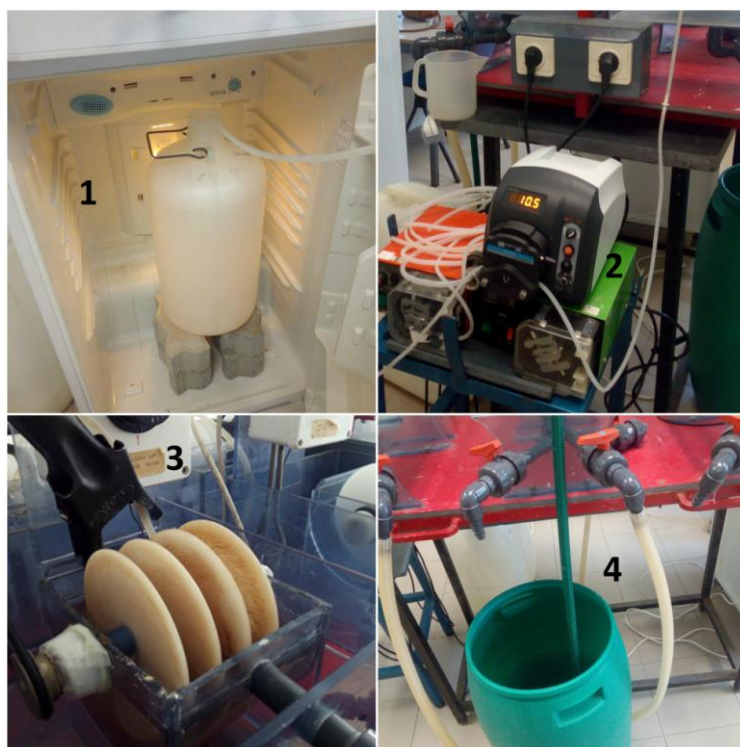


Figura 4.3. Vista detalhada da instalação piloto (Fotografias da autora). 1- Solução de alimentação refrigerada; 2- Bomba peristáltica; 3- Reator biológico com biofilme desenvolvido; 4- Reservatório de descarga de efluente.

4.1.1. Água residual

Foram realizadas duas recolhas pontuais de água residual na ETAR de Fernão Ferro, uma no dia 20 de Junho de 2016 e outra no dia 12 de Julho de 2016. Cada uma das amostras tinha um volume de 240 L, ou seja, o volume total necessário para que se realizassem os ensaios com a mesma água residual. Após cada recolha, a AR manteve-se refrigerada numa câmara frigorífica a 3,3°C. A **Figura 4.4** mostra o procedimento envolvido na recolha de água residual na ETAR de Fernão Ferro.



Figura 4.4. Recolha da água residual utilizada no trabalho experimental (Fotografia da autora).

4.1.2. Água residual sintética

A água residual sintética (substrato) foi utilizada para simular um efluente doméstico. Neste estudo, durante a etapa de desenvolvimento do biofilme, para além do recurso à água residual doméstica proveniente de uma ETAR, foi também necessária a utilização de um complemento com AR sintética para obter a concentração de CQO pretendida de $125 \text{ mg O}_2\cdot\text{L}^{-1}$, uma vez que, a concentração inicial de CQO da AR real era de $40 \text{ mg O}_2\cdot\text{L}^{-1}$ e ia diminuindo ao longo do tempo, apesar de ficar conservada numa câmara frigorífica a $3,3^\circ\text{C}$.

Foi preparada uma solução concentrada de substrato, adaptada de Dang *et al.* (1989) e Domingos (1999), para evitar a sua preparação diária e a introdução sucessiva de erros de pesagem de cada composto. A concentração da solução concentrada foi de $14\,000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ e ficou conservada num frigorífico a 4°C . Desta forma, para os $14 \text{ L}\cdot\text{dia}^{-1}$ de alimentação, o volume que se retirou desta solução, em mL, foi igual ao valor de CQO que era necessário para perfazer os $125 \text{ mg O}_2\cdot\text{L}^{-1}$. A **Tabela 4.2** mostra a composição da solução e as concentrações de cada composto.

Tabela 4.2. Composição do efluente doméstico simulado (adaptado de Dang *et al.*, 1989; Domingos, 1999).

Composto	$\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$
Glucose	8,7500
Peptona	1,7500
Extrato de Levedura	0,8750
KH_2PO_4	1,4000
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2,6250
$\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,3500
$\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,0350
$\text{FeCl}_3\cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,0018
$\text{MnSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,0175

4.1.3. Material

Fármacos:

- Fármaco E2: marca, *Alfa Aesar*, com a referência L03801, com 99% de pureza. Consultar a ficha técnica de segurança no **Anexo I**, para mais detalhes sobre o fármaco;
- Fármaco EE2: marca, *Sigma Aldrich*, com a referência E4876-1G, com 98% de pureza. Consultar a ficha técnica de segurança no **Anexo II**, para mais detalhes sobre o fármaco.

Sistema de HPLC-DAD:

- Cromatógrafo, marca *Waters Alliance*, tipo 2690 de bomba quaternária associado a um detector de fotodíodos, marca *Waters*, tipo 996;
- Pré-coluna C18, marca *Phenomenex*, KJ0-4282;
- Coluna *Luna* 5µm C18 (2) 100 Å (OOF-4252-YO), LC Column 150 x 3 mm.

Reagentes:

- Acetonitrilo, marca *Carlo Erba – Heagenis*, MW(g.mol⁻¹) 41,05;
- Metanol, marca *Carlo Erba – Heagenis*, MW(g.mol⁻¹) 32;
- Ácido Fórmico 98% PA-ACS, marca *Panreac*, 98% de pureza, MW(g.mol⁻¹) 46,03;
- DMSO (Dimetilsulfóxido), marca *Carlo Erba – Heagenis*, MW(g.mol⁻¹) 78,13.

Sistema de filtração a vácuo:

- Bomba de vácuo, marca *Millipore Waters*, tipo DOA-V130-BN, com uma pressão de 1200 bar;
- Filtros de micro fibra de vidro *Filter-Lab* de porosidade 1,2 µm, 47 mm;
- Filtros *Macherey-Nagel* de porosidade 0,4 µm, 45 mm;
- Filtros Millipore de porosidade 0,22 µm, 47mm.

Balanças:

- *Kern* 470-36, Max 2000 g, Min 0,5 g, d=0,01 g, e=0,1 g;
- *Mettler Toledo* AG 204, Max 210 g, d=0,1 mg.
- Barras SBSE (Stir Bar Sorptive Extraction), marca *Gerstel Twister*, tipo GC 011555-001-00, espessura do filme de 1 mm e comprimento da barra de 20 mm;
- *Acrodisc* LC 13 - PVDF, marca *Gelman*, porosidade de 0,2 µm;
- Agitadores magnéticos, marca *J.P. Selecta*, tipo *Agitamatic-N*;
- Sistema de fluxo de azoto alimentado por uma botija, pressão a 15°C: 200 bar ± 5%;
- Equipamento de ultrassons, marca *Julabo*, tipo USR 3, frequência de 35 KHz;
- Sistema de aquecimento em banho de água, marca *SBS*;
- Vortex, marca *Fisher Bioblock Scientific*, modelo Top-Mix 11118;
- Micropipeta, marca *Autoclavable*, modelo *BioPette Plus* (de 20 a 200 µL);
- Utilização do programa *MassLynx* V4.0 para analisar os cromatogramas.

4.2. Métodos

4.2.1. Crescimento do biofilme

É essencial controlar o crescimento do biofilme até atingir o estado estacionário, de forma a garantir uma remoção dos compostos alvo no momento em que se inicia a injeção dos mesmos. Para assegurar e controlar o crescimento de biofilme no reator foi necessário realizar o seguinte procedimento:

- Preparação semanal da solução mãe concentrada, com os compostos indicados na **Tabela 4.2**, pesando as quantidades apresentadas para um balão de 1L e diluindo em água desmineralizada.

- Preparação da solução de alimentação para o reservatório de armazenamento: para além dos 14L de AR real com uma concentração de CQO de aproximadamente $40 \text{ mg O}_2\cdot\text{L}^{-1}$, foi necessário juntar um volume de 85 mL da solução concentrada de AR sintética, ponto **4.1.2**, para que o valor chegasse aos $125 \text{ mg O}_2\cdot\text{L}^{-1}$. O processo de alimentação foi realizado diariamente e a solução de alimentação foi mantida a 4°C .

- O crescimento do biofilme teve a duração de cerca de 7 dias.

- Calibração diária das bombas peristálticas, utilizando uma proveta graduada e um cronómetro.

- Controlo diário das concentrações da CQO à entrada e saída do reator.

- Controlo dos sólidos de dois em dois dias.

4.2.2. Modo operativo utilizado nos Ensaios

O modo operativo utilizado foi baseado no método elaborado pelas autoras Fernandes (2016) e Vicente (2016):

- Recolha de 250 mL de amostra à saída do reator, **Figura 4.5 a)**;
- Filtração da amostra através de um sistema de filtração a vácuo com filtros de 1,2 e 0,4 μm e colocar num erlenmeyer, **Figura 4.5 b)**;
- Adição de 25 g ($100 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) de cloreto de sódio (NaCl) à amostra filtrada;
- Mergulho da barra de agitação SBSE na amostra preparada;
- Tapar o erlenmeyer, envolvê-lo com um plástico preto e levar a agitar durante 3 horas a 900 rpm, **Figura 4.5 c)**;

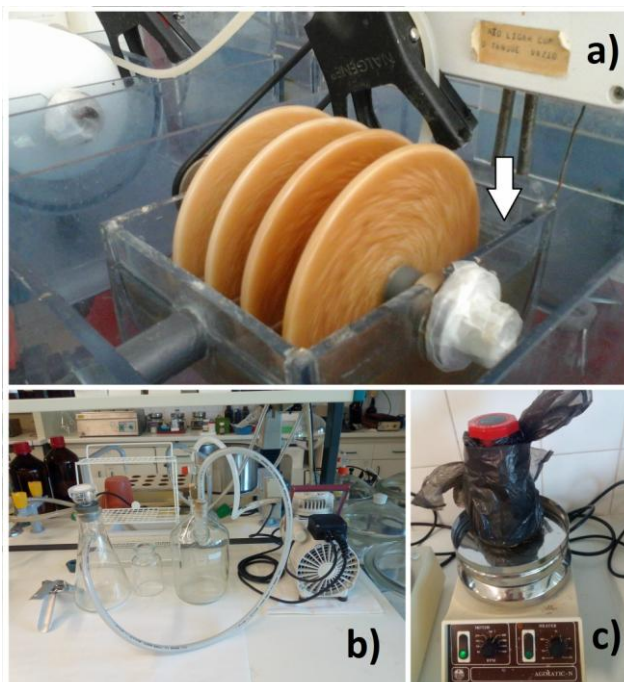


Figura 4.5. Primeiras etapas do processo de extração com a técnica SBSE (Fotografias da Autora). **a)** Recolha da amostra no interior do reator; **b)** Filtração a vácuo; **c)** Agitador com o erlenmeyer que contém a amostra e a barra.

Processo de dessorção:

- Extração da barra para um *vial* com 3 mL de acetonitrilo (CH_3CN), **Figura 4.6 a)**;
- Agitação durante 1 hora a 300 rpm;
- Aquecimento em banho de água, a 60°C durante 10 minutos, **Figura 4.6 b)**;

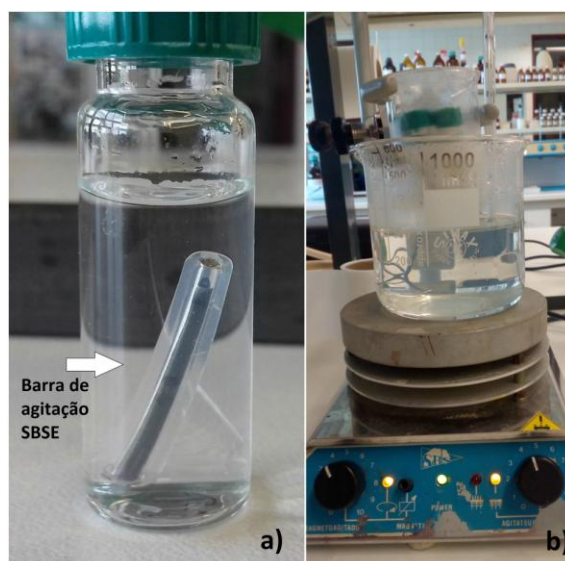


Figura 4.6. Etapas do processo de dessorção (Fotografias da Autora). **a)** *Vial* com a barra de SBSE em acetonitrilo; **b)** Aquecimento em banho de água a 60°C.

Sonicação da solução resultante:

- Este processo consiste na dessorção do composto da barra para o líquido que está no *vial*;
- Colocar o *vial* com a barra num copo e colocar um pouco de água no copo para facilitar o processo de sonicação;
- Levar aos ultrassons entre 5 a 10 minutos, dependendo da frequência do equipamento. Neste caso, **Figura 4.7**, o tempo de sonicação era de 5 minutos com uma frequência de 35 KHz;
- Remover a barra da solução sonicada.



Figura 4.7. Equipamento de ultrassons (Fotografia da Autora).

Preparação da solução resultante para a injeção em HPLC-DAD:

- Concentrar até à secura (evaporar) a solução sonicada sob fluxo de azoto, **Figura 4.8 a**);
- Retomar com 200 μ L de metanol (CH_3OH), com um fator de concentração de 1250, **Figura 4.8 b**);
- Agitar o conteúdo num *vortex* para garantir a mistura de toda a amostra concentrada com o Metanol, **Figura 4.8 c**);
- Colocar a amostra resultante dentro de um *vial* pequeno com um *insert* de 200 μ L e injetar em HPLC-DAD, **Figura 4.8 d**).

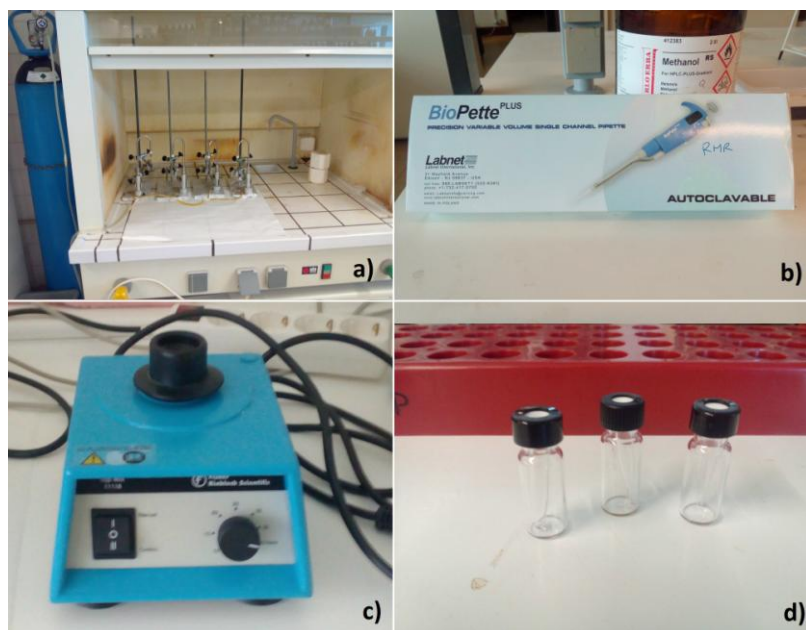


Figura 4.8. Etapas do processo de preparação da amostra para a injetar no HPLC-DAD (Fotografias da Autora). **a)** Sistema de fluxo de azoto; **b)** Micropipeta para retomar a amostra evaporada com metanol; **c)** Vortex; **d)** Vials com insert de 200 μL .

Injeção em HPLC-DAD:

- Eluição isocrática: 50% de água ultra pura filtrada (filtro de 0,22 μm) com 0,1% de ácido fórmico (HCOOH); 50% de acetonitrilo, **Figura 4.9 b)**;
- Tempo de corrida: 10 minutos;
- Fluxo: 0,5 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$;
- Volume de injeção: 20 μL ;
- Coluna cromatográfica: Luna 5 μm C18 (2) 100 Å (OOF-4252-YO), **Figura 4.9 c)**;
- Pré-coluna C18, marca Phenomenex, KJ0-4282.



Figura 4.9. Etapa de injeção no HPLC-DAD (Fotografias da Autora). **a)** Equipamento HPLC-DAD; **b)** Eluentes; **c)** Coluna cromatográfica.

Lavagem e condicionamento da barra SBSE:

- Colocar 3 mL de DMSO para um copo;
- Aplicar a barra no copo com o solvente e levar a agitar durante 1 hora a 100 rpm;
- Colocar 3 mL de acetonitrilo para um *vial* e juntar a barra, levar a agitar durante aproximadamente 12 horas a 100 rpm.

4.2.3. Parâmetros de Controle

- Carência Química de Oxigênio (CQO):

A determinação da CQO foi elaborada através do método de refluxo aberto e durante a fração solúvel das amostras. O modo operatório pode ser consultado no **Anexo III**.

- Sólidos Suspensos Totais (SST), Sólidos Suspensos Voláteis (SSV) e Sólidos Suspensos Não Voláteis (SSNV):

O modo operatório e as fórmulas utilizadas para determinar os SST, SSV e SSNV encontram-se descritos no **Anexo IV**.

- pH:

O pH da matriz é uma variável muito importante na técnica de SBSE. Condições muito ácidas ou básicas não são recomendadas, para evitar a degradação química do PDMS existente nas barras de agitação utilizadas nesta técnica (Nogueira, 2012).

No decorrer dos ensaios mediu-se o pH da solução de alimentação, para verificar a sua estabilidade. O pH foi determinado pelo método potenciométrico, com recurso a um aparelho de marca *WTW series - Inolab*, modelo ION 735, **Figura 4.10**.

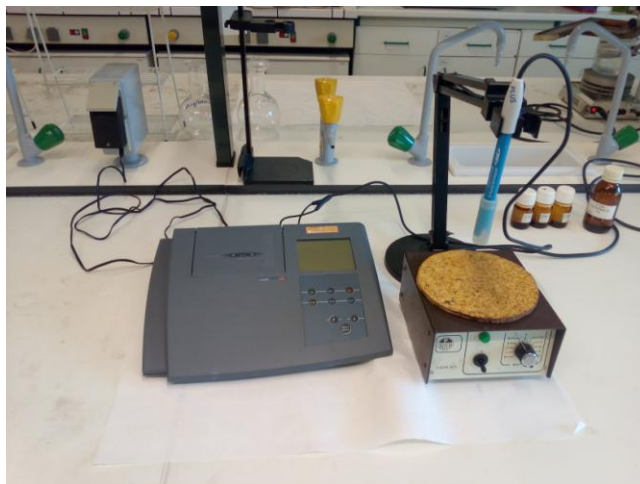


Figura 4.10. Potenciômetro utilizado para medir o pH da alimentação (Fotografia da Autora).

4.2.4. Curvas de Calibração e determinação do Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ)

- Curvas de Calibração utilizadas nos ensaios:

Através destas curvas de calibração foi possível encontrar a equação da reta adequada para calcular as concentrações de E2 e EE2 existentes nas amostras analisadas. As curvas de calibração foram elaboradas com fármaco misto, isto é, com o fármaco E2 e EE2 em simultâneo. Este fato foi possível, isto é, a junção dos dois fármacos na mesma solução, porque têm tempos de retenção diferentes, não havendo qualquer tipo de interação entre eles e, por isso, serem fáceis de detetar no equipamento.

Os padrões de fármaco misto foram preparados em água desmineralizada, com concentrações de 25, 50, 100 e 200 $\mu\text{g.L}^{-1}$ e posteriormente refrigerados a 4°C. Após a extração dos compostos com as barras SBSE, foram injetadas três amostras de cada concentração no HPLC-DAD, com o procedimento descrito no ponto **4.2.2**. As áreas dos cromatogramas resultantes destas injeções foram analisadas no comprimento de onda de 281 nm.

- Determinação do Limite de Detecção (LD) e do Limite de Quantificação (LQ):

Em termos quantitativos, o LD representa o mínimo teórico medido, a partir do qual é possível detetar a presença do analito (E2 ou EE2) com uma certeza estatística razoável, ou

seja, corresponde à mais pequena quantidade de substância a analisar que pode ser detetada numa amostra mas não necessariamente quantificada como valor exato. Em termos qualitativos, corresponde à concentração mínima que é possível distinguir do branco, isto é, de uma amostra que contém a mesma matriz mas não contém o analito. O LQ representa a menor concentração medida, a partir da qual é possível a quantificação do analito com uma determinação exatidão e precisão (Huber, 2007; ICH, 1996).

A determinação do LD e LQ do método SBSE, foi calculada através da seguinte fórmula (Shrivastava & Gupta, 2011):

$$LD = X_{b1} + 3S_{b1}$$

$$LQ = X_{b1} + 10S_{b1}$$

Onde:

- X_{b1} é a média da área do pico no tempo de retenção do composto E2/EE2 no branco;
- S_{b1} é o desvio padrão do X_{b1} .

4.2.5. Ensaio 1 com uma concentração de 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de E2

Neste ensaio, utilizou-se uma concentração constante à entrada do reator de 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de E2 e a alimentação (AR) com uma concentração de CQO de 125 $\text{mg O}_2.\text{L}^{-1}$, correspondente a um efluente tratado, de acordo com o Decreto-Lei 152/97, de 19 de Junho. Teve a duração de 16 dias e os primeiros 7 dias destinaram-se apenas ao crescimento do biofilme.

No decorrer do ensaio, foram realizados os processos descritos nos pontos **4.2.1**, **4.2.2** e **4.2.3**, acrescentando-se as seguintes etapas (Fernandes, 2016; Vicente, 2016):

- Preparação de uma solução concentrada de E2 em metanol, com uma concentração de 1 400 mg.L^{-1} e refrigerada a 4°C:
 - Colocar 14 mg de E2 para um balão de 10 mL e perfazer com metanol.
- Da solução padrão de E2 em metanol, retirava-se diariamente 1 mL para injetar na solução de alimentação, isto é, para alcançar a concentração pretendida de 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de fármaco;
- Recolha diária de 250 mL de amostra à saída do reator;
- Recolha de 2 em 2 dias, de 250 mL de amostra à entrada do reator para controlar os sólidos, a concentração de fármaco e de CQO.

É importante referir que a preparação da alimentação com o fármaco diferiu um pouco da preparação na etapa de crescimento do biofilme, ponto **4.2.1**, pois a solução concentrada de fármaco preparada em metanol contribuía com cerca de 86 $\text{mg O}_2.\text{L}^{-1}$ de CQO nos 14L de alimentação, consultar **Anexo VII**. Desta forma, a alimentação foi preparada com a AR real,

que tinha uma concentração de cerca de $40 \text{ mg O}_2\cdot\text{L}^{-1}$ de CQO e com a solução de E2. A meio do ensaio foi necessário adicionar um pouco da solução concentrada de AR sintética, visto que, a concentração de CQO da AR real diminuía ligeiramente ao longo do tempo.

Neste ensaio, para além da realização do procedimento descrito no ponto **4.2.2**, foi acrescentado um passo que consistiu na filtração da amostra evaporada através de um *acrodisc* de $0,2 \mu\text{m}$ de porosidade, **Figura 4.11 a)**, com o intuito de proteger o equipamento HPLC-DAD. Em seguida, encontra-se o procedimento detalhado deste passo adicional:

- Após a evaporação da amostra e a retoma com $200 \mu\text{L}$ de Metanol, filtrou-se o concentrado com recurso a um conjunto de seringa com *acrodisc*, **Figura 4.11 b)**;

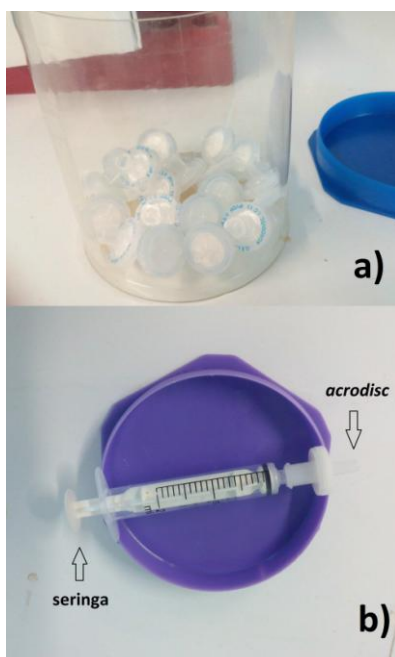


Figura 4.11. Material utilizado na última filtração da amostra (Fotografias da Autora). **a)** *Acrodiscs*, **b)** Seringa com *acrodisc*, utilizada no processo de filtração.

- Colocou-se a amostra filtrada num *vial* com um *insert* de $200 \mu\text{L}$ e seguiu-se o processo da injeção no HPLC-DAD.

Ao finalizar este ensaio, procedeu-se à manutenção de todo o material e equipamento, para garantir as mesmas condições iniciais entre ensaios. A manutenção baseou-se em retirar o biofilme dos discos e do reator e lavar com água e lixívia, e novamente água, todo o sistema da instalação piloto.

4.2.6. Ensaio 2 com uma concentração de $100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de E2 e EE2

Neste ensaio, utilizou-se uma concentração à entrada do reator de $100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de fármaco misto, E2 e EE2, e a solução de alimentação (AR) com uma concentração de CQO de 125 mg

$\text{O}_2.\text{L}^{-1}$, correspondente a um efluente tratado, de acordo com o Decreto-Lei 152/97, de 19 de Junho. O ensaio durou 16 dias, os primeiros 7 dias destinaram-se apenas para o crescimento do biofilme.

No decorrer deste ensaio, foram realizados os processos descritos nos pontos **4.2.1**, **4.2.2** e **4.2.3**, acrescentando-se as seguintes etapas (Fernandes, 2016; Vicente, 2016):

- Preparação de uma solução concentrada de E2 e EE2 em metanol, com uma concentração de $1\,400\text{ mg}.\text{L}^{-1}$ e refrigerada a 4°C :
 - Colocar 14 mg de E2 e 14 mg de EE2 para um balão de 10 mL e perfazer com metanol.
- Da solução padrão de E2 e EE2, retirava-se diariamente 1 mL para injetar na solução de alimentação, isto é, para alcançar a concentração pretendida de $100\text{ }\mu\text{g}.\text{L}^{-1}$ de cada composto;
- Recolha diária de 250 mL de amostra à saída do reator;
- Recolha de 2 em 2 dias, de 250 mL de amostra à entrada do reator para controlar os sólidos, a concentração de fármaco e de CQO.

A adição diária de fármaco na solução de alimentação continha E2 e EE2, onde cada fármaco teve, igualmente, uma concentração de $100\text{ }\mu\text{g}.\text{L}^{-1}$, nos 14L de AR. À semelhança do primeiro ensaio, a solução concentrada com os dois fármacos também contribuiu, pelos mesmos motivos, com cerca de $86\text{ mg O}_2.\text{L}^{-1}$ de CQO para a alimentação do reator, consultar **Anexo VII**.

As diferenças existentes nos dois ensaios consistiram na preparação da solução padrão de fármaco em metanol, que neste ensaio foi preparada com os dois fármacos em simultâneo, e na exclusão do passo da filtração com *acrodisc*, devido aos resultados apresentados no ponto **5.3.4**.

4.2.7. Método de quantificação do E2 e EE2 pelo processo de extração SBSE

Segundo Fernandes (2016) e Vicente (2016), o processo para determinar a concentração de E2 e EE2 existente nas amostras, está descrito nas seguintes etapas:

1. Análise do cromatogramas no comprimento de onda 281 nm, **Figura V.1**;
2. Identificação do pico de cada composto através do tempo de retenção e do espectro, **Figura V.2**:

Tempo de retenção do E2: 4,4 minutos

Tempo de retenção do EE2: 5,6 minutos

3. Quantificação da área do pico de cada composto;

4. Determinação da concentração de E2 e EE2 através da fórmula obtida pela curva de calibração, descrita no ponto 4.2.4 e representada no ponto 5.1;

$$\text{Concentração de E2 } (\mu\text{g.L}^{-1}) = \frac{\text{Área do pico} + 25,261}{1,9628}$$

$$\text{Concentração de EE2 } (\mu\text{g.L}^{-1}) = \frac{\text{Área do pico} + 62,739}{3,1572}$$

4.2.8. Métodos analíticos realizados no decorrer dos ensaios

- Curva de Calibração em Metanol:

Este teste teve como objetivo comparar a eficiência da barra SBSE na presença de metanol e na presença de água desmineralizada. Como ambos os fármacos em estudo são hidrofóbicos, terão mais afinidade com o metanol o que leva a não se aderirem à barra. Na presença de água o processo é inverso e por isso os fármacos terão mais tendência em se aderirem à barra.

Os padrões foram preparados em metanol, com concentrações de 50, 100 e 200 $\mu\text{g.L}^{-1}$ e posteriormente refrigerados a 4°C. Após a preparação dos padrões com as barras SBSE, foram injetadas três amostras de cada concentração no HPLC-DAD, com o procedimento descrito no ponto 4.2.2. As áreas dos cromatogramas resultantes destas injeções foram analisadas no comprimento de onda de 281 nm.

- Curva de Calibração direta:

A elaboração desta curva de calibração com padrões diretos teve o objetivo de encontrar uma equação da reta adequada, para calcular as concentrações de E2/EE2 existentes nas amostras dos testes diretos auxiliares, realizados no decorrer dos ensaios. As concentrações dos padrões foram de 200, 500, 1000 e 2000 $\mu\text{g.L}^{-1}$, para garantir a detecção dos fármacos no HPLC-DAD. Os padrões foram preparados com E2 e EE2, como anteriormente, e colocaram-se 200 μL^{-1} de cada padrão diretamente em *vials*. Foram injetados duplicados de cada concentração no HPLC-DAD, sem utilizar o processo de extração em SBSE.

- Preparação dos brancos:

A preparação de brancos é essencial para análise dos cromatogramas e, também para a determinação do LD e LQ. Prepararam-se dois tipos de brancos, (i) com a matriz de água desmineralizada e (ii) com a matriz de AR. Os brancos de água desmineralizada foram usados para calcular o LD e o LQ, os brancos de AR foram analisados no início de cada ensaio antes da injeção com E2 e EE2, para verificar se a AR já tinha alguma quantidade dos compostos alvo.

Os brancos em água desmineralizada, foram preparados utilizando o processo descrito no ponto 4.2.2, em que os 250 mL de amostra são, no entanto, 250 mL de água desmineralizada sem qualquer tipo de fármaco. Os brancos de AR foram preparados do mesmo modo mas com 250 mL de AR.

- Fotodegradação dos fármacos:

Este estudo serviu para verificar se os fármacos são vulneráveis a quando expostos à luz solar. Foram preparados dois padrões com uma concentração de $500 \mu\text{g.L}^{-1}$ de E2 e EE2. Um dos padrões ficou exposto à luz solar e o outro padrão isolado da luz solar, mas ambos permaneceram à temperatura ambiente. O ensaio durou cinco dias, diariamente foram retiradas amostras diretas de cada balão e injetadas no HPLC-DAD, ou seja, sem recurso às barras SBSE.

- Adsorção de E2 e EE2 aos materiais da instalação piloto:

A realização de testes de adsorção dos fármacos aos diferentes materiais da instalação piloto, como os reservatórios de armazenamento e as mangueiras de alimentação, verificam se os fármacos colocados no reservatório de alimentação chegam ao reator. De acordo com Fernandes (2016) e Vicente (2016), E2 e EE2 não adsorvem aos reservatórios de alimentação nem às mangueiras de silicone que levam a alimentação para os reatores. Deste modo, não foi necessário a realização do teste de adsorção, pois os materiais e os fármacos utilizados nos ensaios foram os mesmos das autoras.

- Teste de adsorção de E2 e EE2 ao *acrodisc*:

O processo de filtração das amostras com *acrodisc* antes da injeção em HPLC-DAD, evita a contaminação ou colmatação da coluna e do equipamento com diversos compostos. Devido a alguns resultados inesperados e inconclusivos no início do primeiro ensaio, testaram-se todos os passos de preparação das amostras, onde se incluíram os *acrodisc*, para que se pudesse aferir a possível interferência com os resultados e a adsorção dos compostos ao *acrodisc*. Com o intuito de confirmar o possível problema associado a esta filtração, foi realizado este teste de adsorção dos fármacos em estudo ao *acrodisc*.

Desta forma, foram preparadas amostras de água residual, água residual sintética, água desmineralizada e de um padrão com E2 e EE2. Todas as amostras tinham uma concentração de $200 \mu\text{g.L}^{-1}$ de E2 e EE2 e foram injetadas diretamente no HPLC-DAD, em duplicado. No entanto, um dos duplicados foi filtrado com um *acrodisc* de $0,2 \mu\text{m}$ e o outro não, assim é possível verificar se existe uma eventual adsorção dos fármacos ao *acrodisc*.

5. Resultados e Discussão

5.1. Curvas de Calibração utilizadas nos ensaios

Nas **Figura 5.1** e **Figura 5.2** mostram-se as curvas de calibração utilizadas nos ensaios. Estas curvas de calibração foram utilizadas para determinar as concentrações de E2 e EE2 presentes nas amostras analisadas ao longo dos ensaios.

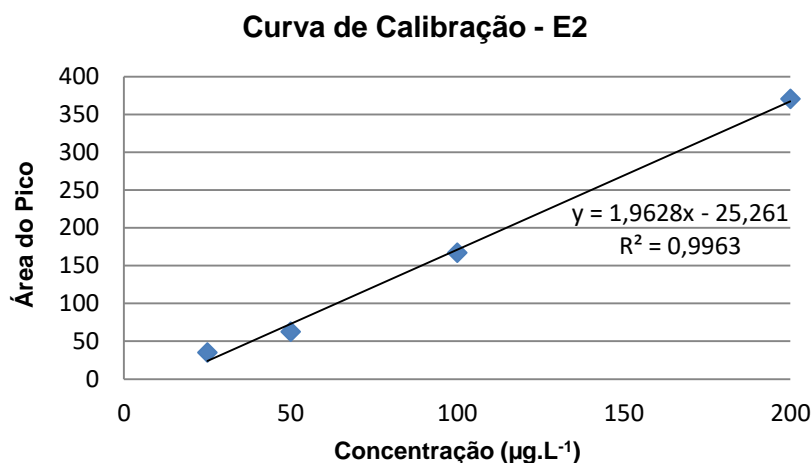


Figura 5.1. Curva de Calibração de E2 utilizada ao longo dos ensaios.

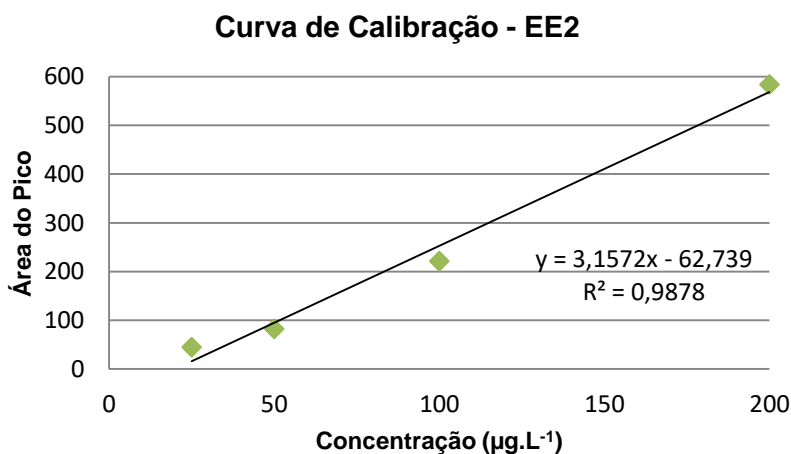


Figura 5.2. Curva de Calibração de EE2 utilizada no segundo ensaio.

Para determinar as concentrações dos fármacos utilizou-se a equação resultante de cada curva de calibração. A equação para calcular a concentração de E2 foi $y = 1,9628x - 25,261$, com um coeficiente de correlação $R^2 = 0,9963$. A equação da curva de calibração para o EE2 foi

$y=3,1572x - 62,739$, com um coeficiente de correlação $R^2=0,9878$. No **Anexo V** estão representados alguns cromatogramas das curvas de calibração e as respetivas áreas dos picos.

- Determinação do Limite de Detecção (LD) e do Limite de Quantificação (LQ):

Os valores de LD e de LQ calculados através das fórmulas apresentadas no ponto **4.2.4**, encontram-se na **Tabela 5.1**. As áreas dos picos dos brancos utilizados para calcular estes limites, podem ser consultadas em anexo na **Tabela VI.1**.

Tabela 5.1. Valores de LD e LQ correspondentes a cada fármaco em estudo.

	E2	EE2	Unidade
LD	20,82	22,12	$\mu\text{g.L}^{-1}$
LQ	35,23	25,03	

5.2. Ensaio 1 com uma concentração de $100 \mu\text{g.L}^{-1}$ de E2

O primeiro ensaio foi realizado com uma concentração de $100 \mu\text{g.L}^{-1}$ de E2 e teve a duração de 16 dias, 7 dias destinados ao crescimento do biofilme e os restantes com a injeção do fármaco. No **Anexo VIII** encontram-se os resultados dos parâmetros de controlo diários obtidos durante a injeção do fármaco.

Na **Figura 5.3** mostram-se algumas fotografias do desenvolvimento do biofilme ao longo deste ensaio, a primeira fotografia mostra o início do crescimento do biofilme, antes da injeção com E2, e as restantes correspondem aos dias 1, 5 e 8, durante a injeção do fármaco na alimentação.

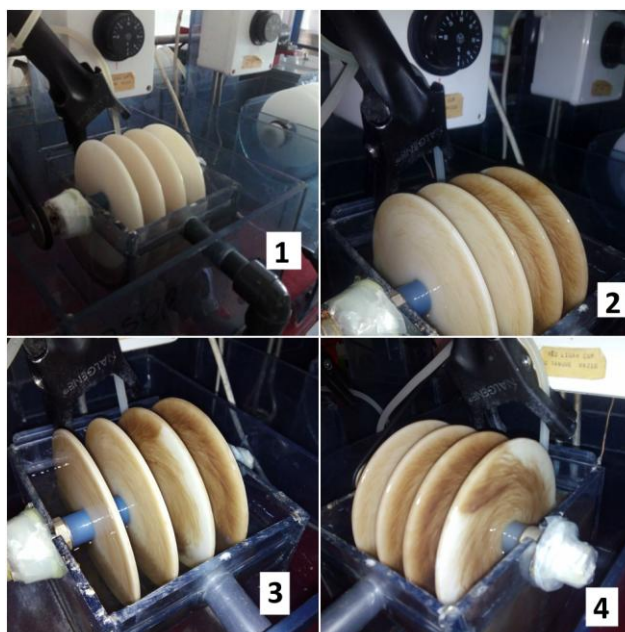


Figura 5.3. Desenvolvimento do biofilme no decorrer do primeiro ensaio (Fotografia da autora). 1- Aspeto do biofilme na etapa de crescimento; 2- Dia 1; 3- Dia 5; 4- Dia 8.

Observando estas figuras, verifica-se uma alteração de cor no biofilme ao longo deste primeiro ensaio, apresentando uma tonalidade castanha. É importante referir que se verificou um rápido desenvolvimento do biofilme.

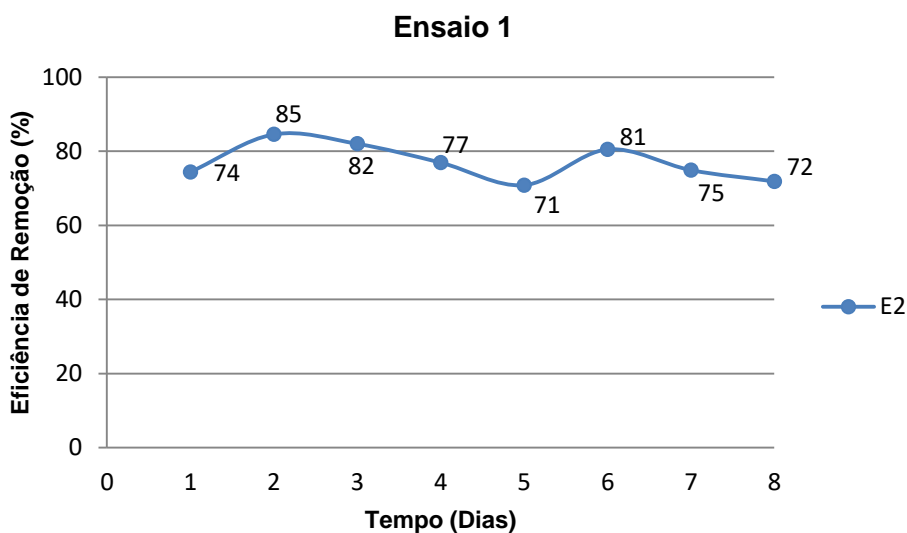
É possível observar um ligeiro aumento da espessura do biofilme e nos últimos dias do ensaio (**Figura 5.3 4**), visualizou-se o desprendimento de algum biofilme do meio de suporte, o que entra em conformidade com o sucedido no estudo de Fernandes (2016) e Vicente (2016), onde à semelhança destes ensaios, a idade do biofilme também não foi controlada.

Na **Tabela 5.2** apresentam-se as concentrações de E2 à entrada e saída do reator, em que o Dia 0 corresponde ao dia em que o fármaco foi injetado na alimentação pela primeira vez. Os cromatogramas e os valores necessários para calcular as concentrações de E2 e a respetiva eficiência de remoção estão apresentados no **Anexo IX**. A eficiência de remoção de E2, calculada através das concentrações à saída do reator, está apresentada na **Figura 5.4**.

Tabela 5.2. Concentrações de E2 à saída do reator, referentes ao primeiro ensaio.

Ensaio 1		
Data	Dia	Concentração à saída ($\mu\text{g.L}^{-1}$)
27/06/2016	0	ND
28/06/2016	1	25,61
29/06/2016	2	15,42
30/06/2016	3	17,96
01/07/2016	4	23,06
02/07/2016	5	29,17
03/07/2016	6	19,49
04/07/2016	7	25,10
05/07/2016	8	28,15

ND- Não Detetável

**Figura 5.4.** Eficiência de remoção de E2 ao longo do primeiro ensaio.

Analisando a **Tabela 5.2**, com as concentrações de E2 à entrada e saída do reator, e a **Figura 5.4**, é possível constatar que as eficiências de remoção correspondentes ao primeiro ensaio, oscilaram entre os 71 e 85% (em termos de valores absolutos), apresentando uma média de remoção de cerca de 76%. Estes valores são bastante otimistas, uma vez que, segundo o estudo desenvolvido por Fernandes (2016) com a mesma metodologia e técnica de extração, as eficiências de remoção de E2 variaram entre 32 e 88% (em termos absolutos), e cerca de 66% como média de remoção.

A **Figura 5.5** compara as concentrações de CQO à entrada e saída do reator e mostra a sua evolução ao longo deste ensaio. Os valores das concentrações de CQO podem ser consultados na **Tabela VIII.1**. A eficiência de remoção de CQO correspondente ao primeiro ensaio está apresentada na **Tabela 5.3**.

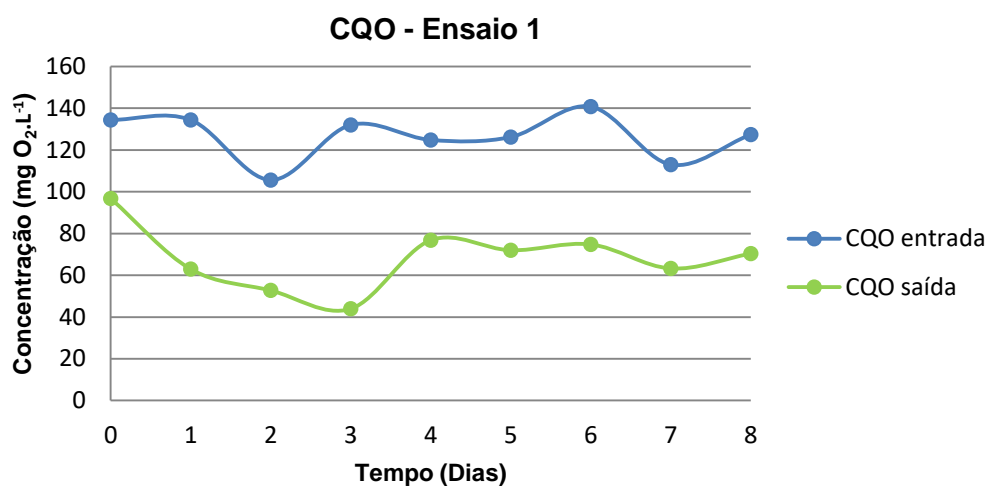


Figura 5.5. Concentrações diárias de CQO à entrada e saída do reator, ao longo do primeiro ensaio.

Tabela 5.3. Eficiência de remoção de CQO ao longo do primeiro ensaio.

Ensaio 1	
Dia	Eficiência de remoção de CQO (%)
0	28,0
1	53,1
2	50,0
3	66,7
4	38,5
5	42,9
6	46,9
7	44,0
8	44,7

Para controlar o processo em termos de carga orgânica, determinou-se a CQO à entrada e saída do reator e a eficiência de remoção de CQO associada, ao longo dos ensaios. De acordo com os valores obtidos nos estudos realizados por Fernandes (2016), Rodrigues (2009) e Vicente (2016), verificou-se que, após os 6 dias foi atingido o regime próximo do estacionário, correspondente à estabilização dos valores da CQO.

A determinação dos SST, SSV e SSNV à saída do reator, **Anexo VIII**, também foi realizada neste primeiro ensaio, com o intuito de verificar se o mesmo decorria numa situação próxima do estado estacionário e se os sólidos interferiam na remoção dos compostos. Neste

ensaio, os sólidos no interior do reator encontravam-se em pequenas quantidades, tendo variado entre 22 e 60 mg.L⁻¹, apresentando uma média de cerca de 43 mg.L⁻¹, o que demonstra que a remoção do E2 estava associada essencialmente à degradação por parte da biomassa fixa aos discos do reator.

Ao longo deste ensaio, o pH manteve-se constante e próximo de neutro, os valores obtidos foram de aproximadamente 6,9.

5.3. Métodos analíticos auxiliares

5.3.1. Curva de Calibração em Metanol

Nas **Figura 5.6** e **Figura 5.7** mostram-se as curvas de calibração em metanol. Estas curvas de calibração foram elaboradas para testar o meio (água ou metanol) mais adequado para extrair os compostos através das barras SBSE.

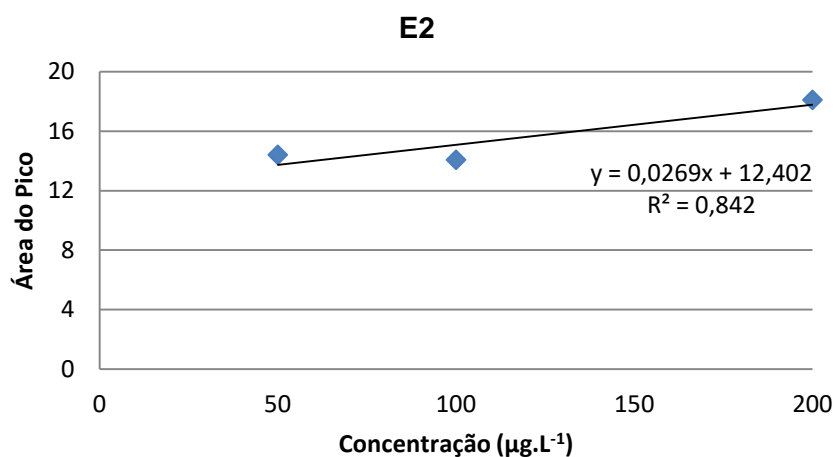


Figura 5.6. Curva de Calibração em metanol de E2.

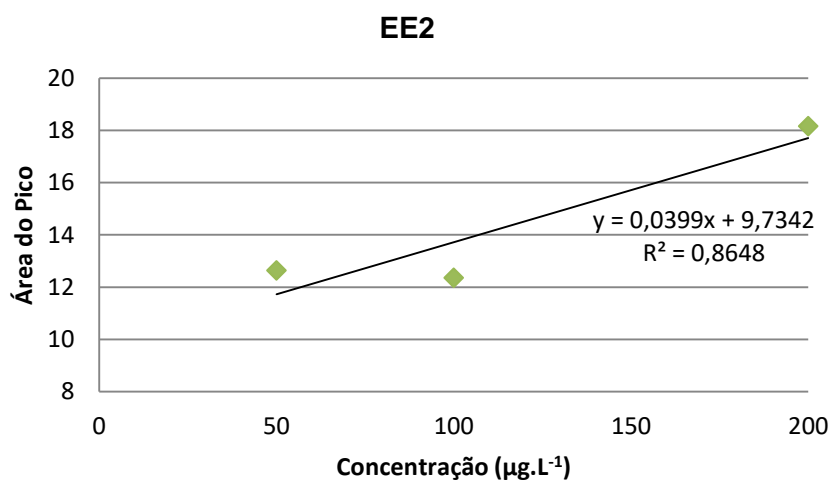


Figura 5.7. Curva de Calibração em metanol de EE2.

A equação resultante da curva de calibração em metanol para o E2 foi $y=0,0269x + 12,402$, com um coeficiente de correlação de $R^2=0,842$. A equação da curva de calibração em metanol para o EE2 foi $y=0,0399x + 9,7342$, com um coeficiente de correlação de $R^2=0,8648$. No **Anexo XII** estão representados alguns cromatogramas das curvas de calibração em metanol e as respectivas áreas dos picos.

Na **Figura 5.8** e na **Figura 5.9** foi possível comparar as curvas de calibração em metanol com as curvas de calibração em água desmineralizada, para cada um dos compostos.

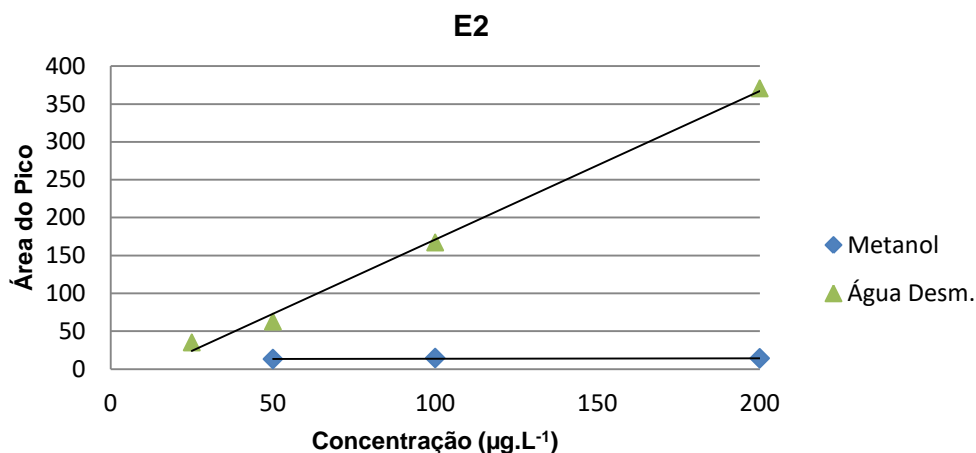


Figura 5.8. Comparação da curva de calibração em metanol com a curva de calibração em água desmineralizada para o E2.

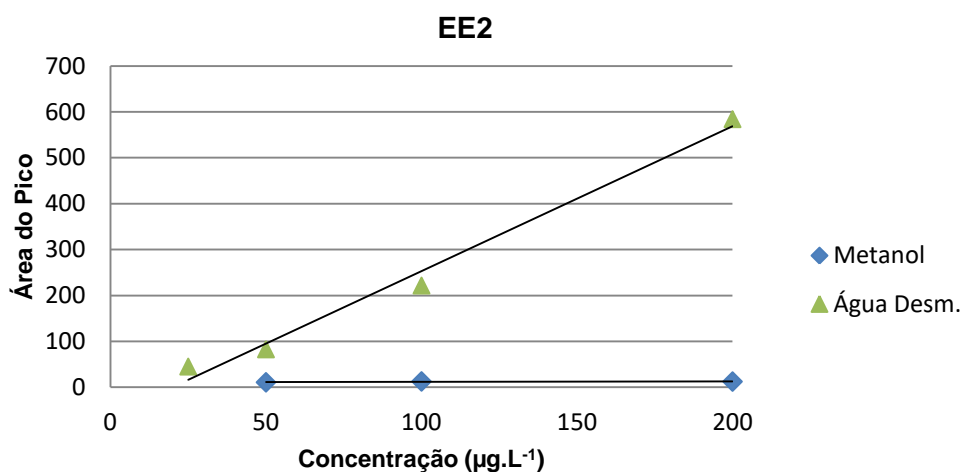


Figura 5.9. Comparação da curva de calibração em metanol com a curva de calibração em água desmineralizada para o EE2.

Analisando estas últimas duas figuras, verificou-se que a curva de calibração em água desmineralizada utilizada ao longo dos ensaios, foi a mais indicada para calcular as concentrações de E2 e EE2 presentes nas amostras. Devido à hidrofobicidade dos compostos

em estudo e com a curva de calibração em água desmineralizada, estes acabam por aderir à barra possibilitando a sua extração e quantificação sem grandes erros associados, como seria o caso da curva de calibração em metanol.

5.3.2. Curva de Calibração direta

As curvas de calibração realizadas com padrões diretos podem ser visualizadas nas **Figura 5.10** e **Figura 5.11**. Estas curvas de calibração foram elaboradas para poder analisar os resultados dos testes auxiliares diretos, ou seja, que não passaram pelo método SBSE e foram injetados diretamente no HPLC-DAD.

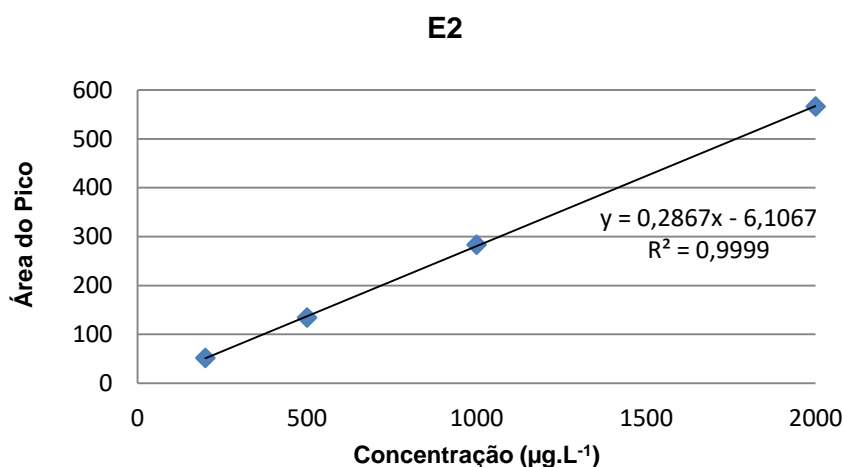


Figura 5.10. Curva de Calibração direta para o E2.

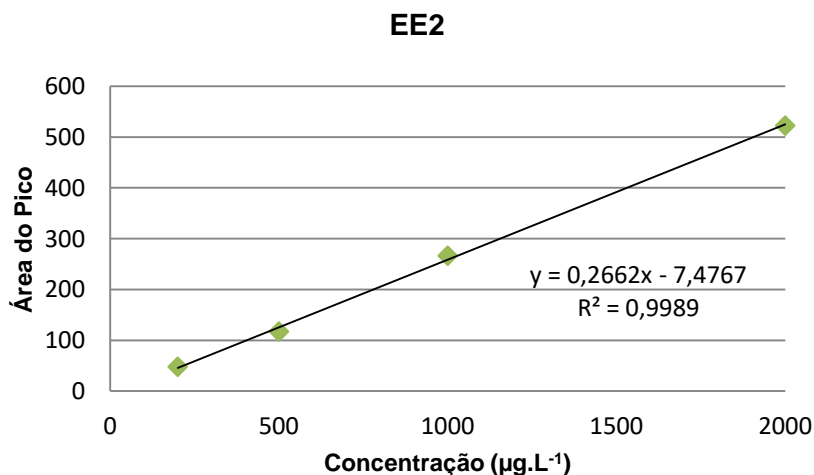


Figura 5.11. Curva de Calibração dedireta para o EE2.

A equação resultante da curva de calibração elaborada através de padrões diretos para o E2 foi $y=0,2867x - 6,1067$, com um coeficiente de correlação de $R^2=0,9999$. A equação da curva de calibração direta para o EE2 foi $y=0,2662x - 7,4767$, com um coeficiente de correlação de $R^2=0,9989$. No **Anexo XIII** estão representados alguns cromatogramas das curvas de calibração de padrões diretos e as respectivas áreas dos picos.

5.3.3. Fotodegradação de E2 e EE2

O teste de fotodegradação serve para verificar se os fármacos são vulneráveis à luz solar e se são degradáveis ao longo do tempo. Na **Tabela 5.4** apresentam-se os resultados de E2 e EE2 expostos à luz solar ao longo de 6 dias, e na **Tabela 5.5** observam-se os resultados dos compostos desprovidos de luz solar com a mesma duração. A determinação das concentrações foi realizada utilizando a curva de calibração direta, visto que estas amostras foram colocadas diretamente no HPLC-DAD, sem passarem pelo processo de SBSE. No **Anexo IV** podem consultar-se os cromatogramas correspondentes ao teste de fotodegradação.

Tabela 5.4. Concentrações de E2 e EE2 ao longo de 6 dias e expostos à luz solar, com uma concentração inicial de 500 $\mu\text{g.L}^{-1}$.

Luz	Concentração de E2 ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Concentração de EE2 ($\mu\text{g.L}^{-1}$)
Dia 0	230,58	894,27
Dia 1	254,99	985,99
Dia 2	317,78	1221,84
Dia 3*	-	-
Dia 4	108,50	435,67
Dia 5	321,27	1234,94

*Não foram apresentados resultados para o Dia 3 porque os cromatogramas apresentavam muito ruído e por isso não foi possível realizar as leituras.

Tabela 5.5. Concentrações de E2 e EE2 ao longo de 6 dias e desprovidos de luz solar, com uma concentração inicial de 500 $\mu\text{g.L}^{-1}$.

S/ Luz	Concentração de E2 ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Concentração de EE2 ($\mu\text{g.L}^{-1}$)
Dia 0	338,70	1300,46
Dia 1	460,78	1759,06
Dia 2	272,43	1051,50
Dia 3	377,07	1444,59
Dia 4	248,02	959,78
Dia 5	241,04	933,58

Analisando estes resultados e as áreas dos picos associadas, que podem ser consultadas no **Anexo IV**, foi possível observar que os compostos não apresentam indícios de degradação ao longo do tempo, mesmo expostos à luz solar. Observou-se também um erro associado ao composto EE2 pois as concentrações vão aumentando ao longo do tempo, algumas até para mais do dobro da concentração inicial de 500 $\mu\text{g.L}^{-1}$. Estes resultados inesperados podem estar associados à utilização de uma micropipeta inadequada para estas concentrações, durante a

elaboração dos padrões. Apesar de serem questionáveis, os resultados associados ao EE2 não deixaram de ser apresentados juntamente com os resultados do E2.

Estes resultados entram em conformidade com os resultados apresentados pelos autores Fernandes (2016), Vicente (2016) e Yilmaz & Kadioglu (2013), que concluíram que E2 e EE2 não apresentavam qualquer indício de degradação, nas mesmas condições testadas.

5.3.4. Adsorção de E2 e EE2 ao *acrodisc*

O teste de adsorção dos fármacos em estudo ao *acrodisc* tem como finalidade averiguar se o E2 e EE2 ficam adsorvidos ao *acrodisc* na filtração final, antes da injeção em HPLC-DAD. Os resultados obtidos das amostras não filtradas e filtradas com *acrodisc*, podem ser consultados na **Tabela 5.6** e **Tabela 5.7**, respetivamente.

Os cálculos analíticos para determinar as concentrações foram realizados com recurso à curva de calibração direta, visto que estas amostras foram colocadas diretamente no HPLC-DAD, sem passarem pelo processo de extração com as barras SBSE. No **Anexo XV** encontram-se os cromatogramas referentes ao teste de adsorção.

Tabela 5.6. Resultados das leituras das amostras não filtradas.

S/ <i>Acrodisc</i>	Concentração de E2 ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Concentração de EE2 ($\mu\text{g.L}^{-1}$)
Solução-mãe de E2 e EE2	61,13	56,37
AR	-	-
Água Desmineralizada	24,79	35,71
AR sintética	28,73	-

Tabela 5.7. Resultados das leituras de amostras filtradas com *acrodisc*.

C/ <i>Acrodisc</i>	Concentração de E2 ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Concentração de EE2 ($\mu\text{g.L}^{-1}$)
Solução-mãe de E2 e EE2	31,97	67,76
AR	-	-
Água Desmineralizada	43,34	37,97
AR sintética	36,05	61,90

Estes resultados foram inconclusivos, algumas amostras não são detetadas no HPLC-DAD, nomeadamente, a AR e outra amostra de AR sintética. Por vezes a concentração do composto na amostra filtrada com o *acrodisc* é mais elevada do que a concentração da mesma amostra não filtrada, o que não acontece em todas as amostras.

Desta forma, devido aos resultados inconclusivos apresentados e à falta de tempo para realizar novos testes de adsorção, optou-se por retirar a filtração com *acrodisc* no decorrer do segundo ensaio. No entanto, para ensaios futuros recomenda-se a realização deste processo de filtração com o intuito de proteger o equipamento HPLC-DAD.

5.4. Ensaio 2 com uma concentração de $100 \mu\text{g.L}^{-1}$ de E2 e EE2

O segundo ensaio foi realizado com uma concentração de $100 \mu\text{g.L}^{-1}$ de E2 e de EE2, teve a duração de 16 dias, 7 dias destinados ao crescimento do biofilme e os restantes com a injeção do fármaco. No **Anexo X** encontram-se os resultados dos parâmetros de controlo diários obtidos durante a injeção do fármaco.

Na **Figura 5.12** mostram-se algumas fotografias do desenvolvimento do biofilme ao longo deste ensaio, a primeira fotografia mostra o início do crescimento do biofilme, antes da injeção com os dois fármacos em estudo, e as restantes correspondem aos dias 1, 5 e 8, durante a injeção de E2 e EE2 na alimentação.

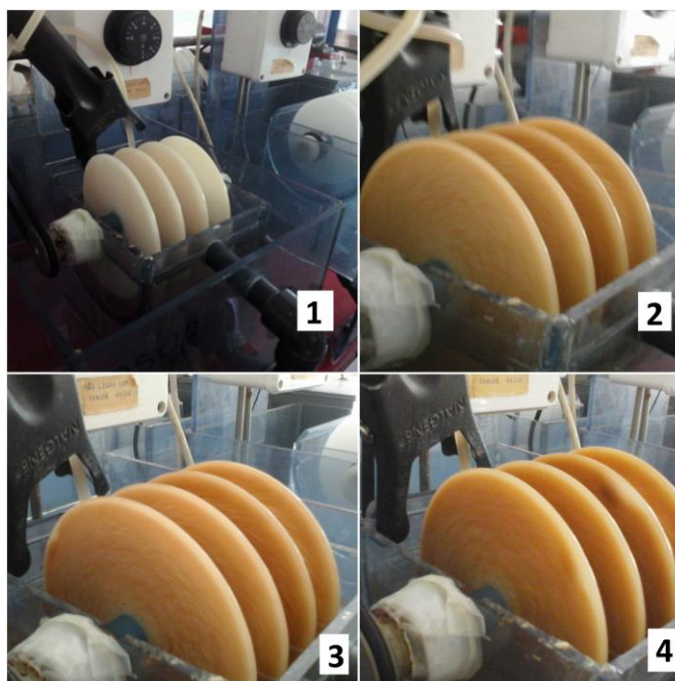


Figura 5.12. Desenvolvimento do biofilme no decorrer do segundo ensaio (Fotografias da autora). 1- Aspeto do biofilme na etapa de crescimento; 2- Dia 1; 3- Dia 5; 4- Dia 8.

Observando estas figuras, verificar-se uma acentuada alteração de cor no biofilme ao longo deste segundo ensaio, apresentando uma tonalidade castanha mais clara, em comparação com o primeiro ensaio. Verificou-se igualmente um rápido desenvolvimento do biofilme.

Foi possível observar um ligeiro aumento da espessura do biofilme. Contrariamente ao primeiro ensaio, o desprendimento do biofilme foi mínimo ou inexistente apesar da idade do biofilme também não ser controlada.

Na **Tabela 5.8** apresentam-se as concentrações de E2 e EE2 à entrada e saída do reator, em que o Dia 0 corresponde ao dia em que o fármaco foi injetado na alimentação pela primeira vez. Os cromatogramas e os valores necessários para calcular as concentrações dos fármacos e as respetivas eficiências de remoção estão representados no **Anexo XI**. As eficiências de remoção de E2 e EE2, calculadas através das concentrações à saída do reator, estão apresentadas na **Figura 5.13** e **Figura 5.14**, respetivamente.

Tabela 5.8. Concentrações de E2 e EE2 à saída do reator, referentes ao segundo ensaio.

Ensaio 2			
Data	Dia	Concentração à saída ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	
		E2	EE2
19/07/2016	0	ND	ND
20/07/2016	1	44,97	115,53
21/07/2016	2	47,13	152,28
22/07/2016	3	14,91	90,82
23/07/2016	4	41,21	152,90
24/07/2016	5	27,14	99,37
25/07/2016	6	41,40	129,48
26/07/2016	7	43,58	161,98
27/07/2016	8	14,04	223,53

ND- Não Detetável

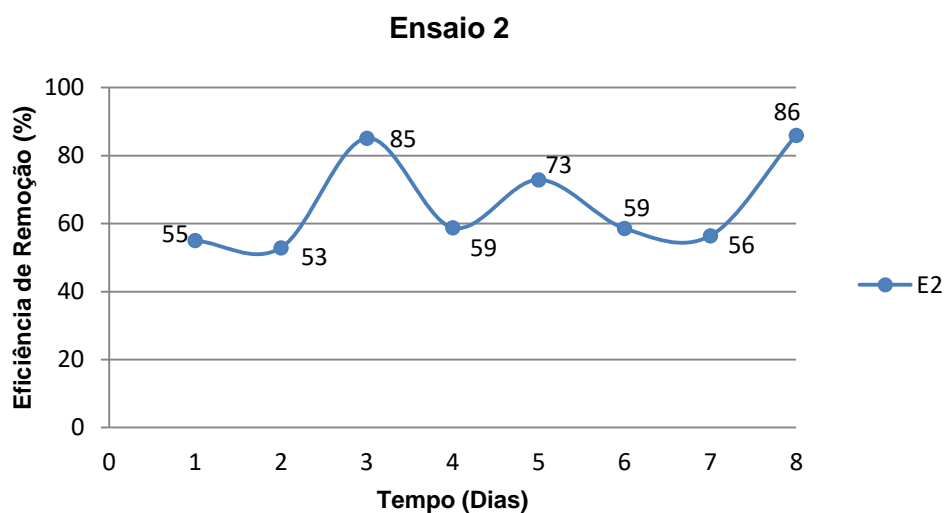


Figura 5.13. Eficiência de remoção de E2 ao longo do segundo ensaio.

Analisando a **Tabela 5.8**, e as concentrações de E2 à entrada e saída do reator, e a **Figura 5.13**, foi possível constatar que as eficiências de remoção para o E2 correspondentes ao segundo ensaio, oscilaram entre os 53 e 86%, apresentando uma média de remoção de 59%. Neste ensaio, a média de remoção baixou um pouco comparativamente com o primeiro ensaio, no entanto, os valores continuam a ser otimistas e de acordo com os resultados apresentados noutros estudos realizados em condições semelhantes.

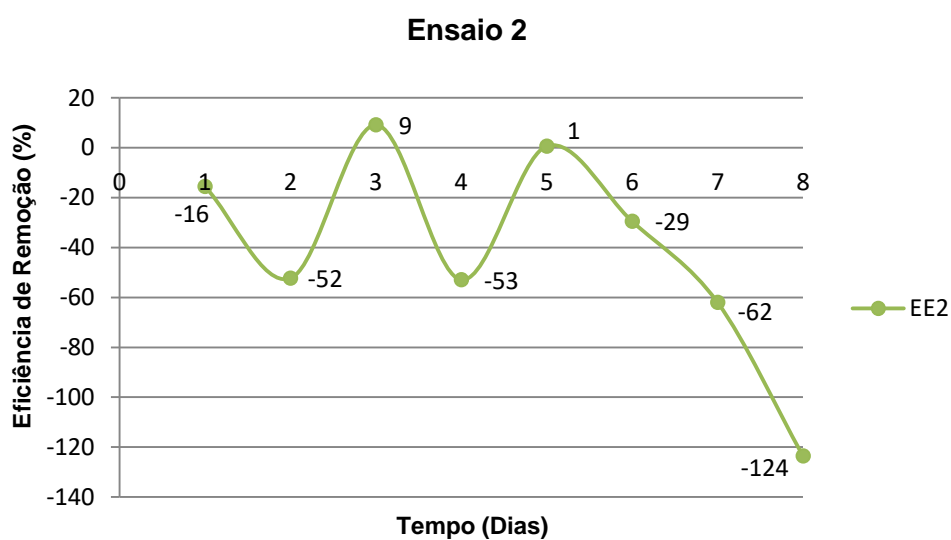


Figura 5.14. Eficiência de remoção de EE2 ao longo do segundo ensaio.

Relativamente ao EE2, as eficiências de remoção não foram as previstas para este ensaio com estas condições, uma vez que oscilaram entre -124 e 9%, apresentando uma média de remoção negativa de -41%, ou seja, não existiu remoção. Ao longo do ensaio nota-se um aumento da concentração de EE2, ficando a ideia de que vai acumulando de dia para dia, não apresentando qualquer tipo de remoção. Segundo Vicente (2016), estudo realizado somente com o EE2 mas com a mesma metodologia e método de extração utilizado neste ensaio, as eficiências de remoção do EE2 variaram entre 0 e 64%, sendo que na maioria foram inferiores a 50%.

Estas diferenças correspondentes ao EE2 podem estar associadas à sua baixa biodegradabilidade e à composição da água residual real. Para uma melhor compreensão da remoção deste composto em água residual é essencial a realização de mais ensaios e estudar a composição do biofilme, de forma a analisar se os microrganismos têm alguma preferência pelo E2 e que tipo de microrganismos são responsáveis pela biodegradação do EE2.

A **Figura 5.15** compara as concentrações de CQO à entrada e saída do reator e mostra a sua evolução ao longo deste ensaio. Os valores das concentrações de CQO podem ser consultados na **Tabela X.1**. A eficiência de remoção de CQO correspondente ao primeiro ensaio está apresentada na **Tabela 5.9**.

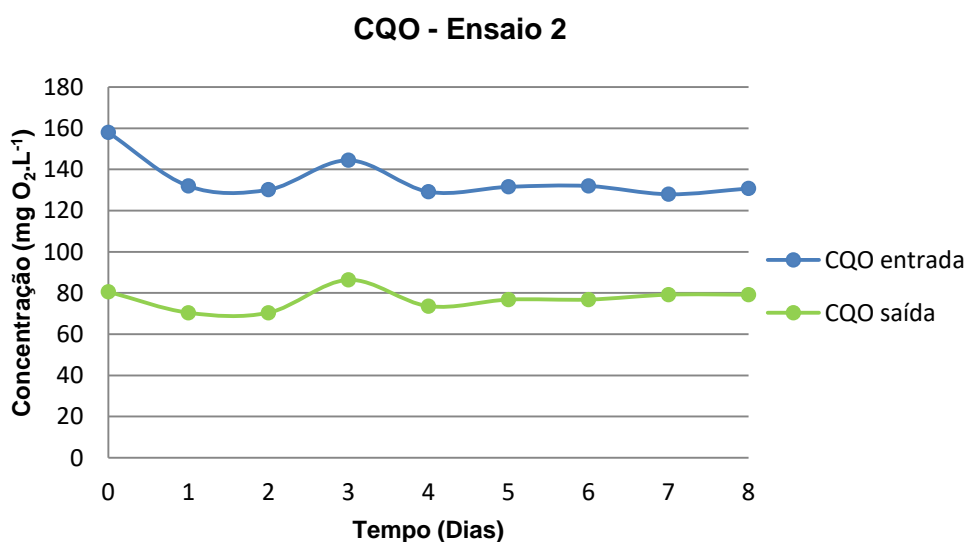


Figura 5.15. Concentrações diárias de CQO à entrada e saída do reator, ao longo do segundo ensaio.

Tabela 5.9. Eficiência de remoção de CQO ao longo do segundo ensaio.

Ensaio 2	
Dia	Eficiência de remoção de CQO (%)
0	49,0
1	46,7
2	45,9
3	40,2
4	43,0
5	41,6
6	41,8
7	38,1
8	39,4

Para controlar o processo em termos de carga orgânica, determinou-se a CQO à entrada e saída do reator e a eficiência de remoção de CQO associada, ao longo dos ensaios. De acordo com os valores obtidos nos estudos realizados por Fernandes (2016), Rodrigues (2009) e Vicente (2016), verificou-se que, após os 6 dias foi atingido o regime próximo do estacionário, correspondente à estabilização dos valores da CQO.

A determinação dos SST, SSV e SSNV à saída do reator, **Anexo X**, também foi realizada no decorrer deste segundo ensaio. Verificou-se que os SST presentes no reator foram ligeiramente mais elevados comparativamente ao primeiro ensaio, tendo variado entre 44 e 194 mg.L⁻¹ e apresentando uma média de cerca de 140 mg.L⁻¹. Demonstra, igualmente ao primeiro ensaio, que a remoção do E2 e EE2 estava associada essencialmente à degradação por parte da biomassa fixa aos discos do reator.

Ao longo deste ensaio, o pH manteve-se constante e próximo de neutro, os valores obtidos foram de aproximadamente 7,1.

6. Conclusões

De acordo com os resultados obtidos, concluiu-se que:

- O crescimento do biofilme com recurso a água residual real e ao processo de discos biológicos, apresentou resultados muito favoráveis e um desenvolvimento notório num curto espaço de tempo.
- O estudo da degradação biológica dos fármacos E2 e EE2 decorreu próximo do regime estacionário e de um modo estável, no decorrer dos dois ensaios realizados.
- No primeiro ensaio, com uma concentração de $100 \mu\text{g.L}^{-1}$ de E2 e $125 \text{mgO}_2\text{.L}^{-1}$ de AR, as eficiências de remoção de E2 variaram entre 71 e 85% (valores absolutos), apresentando uma média de 76%.
- No segundo ensaio, com uma concentração de $100 \mu\text{g.L}^{-1}$ de E2 e EE2 e $125 \text{mgO}_2\text{.L}^{-1}$ de AR, as eficiências de remoção de E2 variaram entre 53 e 86% (valores absolutos), apresentando uma média de 59%. Relativamente ao EE2, estas eficiências variaram entre -124 e 9% (valores absolutos), com uma média de -41%, tendo-se considerado, por isso, que não existiu remoção deste composto.
- As eficiências de remoção correspondentes ao composto EE2 não foram as esperadas e diferiram bastante dos valores apresentados por outros estudos elaborados nas mesmas condições. Essa variação de resultados pode ser associada ao facto do EE2 ser mais persistente e apresentar uma biodegradabilidade bastante menor do que o E2.
- Os resultados obtidos para o E2 foram promissores comparativamente à faixa de eficiências apresentadas por outros processos de tratamento biológicos, nomeadamente, lamas ativadas, onde a disponibilidade de nutrientes e a concentração de carbono não são fatores limitantes.
- Apesar da água residual real ser uma matriz bastante complexa e que, de certo modo, possa ter apresentado dificuldades nas técnicas associadas à quantificação e de deteção dos compostos, considera-se que este estudo contribuiu para uma nova abordagem nestes métodos e aproximou-se das condições reais apresentadas nas ETAR.

6.1. Desenvolvimentos Futuros

Este estudo veio reforçar a ideia de que é possível uma remoção biológica eficiente de 17β -estradiol de água residual real, nomeadamente, através de sistemas de discos biológicos à escala laboratorial. Desta forma, para dar continuidade ao estudo e verificar a sua eficiência à escala real, apresentam-se de seguida sugestões de desenvolvimentos futuros:

- Análise mais detalhada do biofilme criado a partir da AR, para compreender melhor os processos que ocorrem durante a remoção dos compostos, isto é, se fica adsorvido no biofilme ou se é realmente biodegradado.
- Realização de mais ensaios com o EE2 e água residual real, de forma a perceber a causa da não remoção e da diferença de resultados considerável em comparação com o E2.
- Análise e deteção dos fármacos com técnicas que tenham um limite de deteção inferior ao praticado nestes ensaios, de forma a testar concentrações mais próximas da maioria dos outros estudos.
- Testar o tratamento de águas residuais com recurso a reatores de discos biológicos numa escala de tratamento maior, de modo a verificar as suas potencialidades na remoção deste tipo de compostos.

7. Bibliografia

- Administração da Região Hidrográfica do Tejo (ARHT). (2011). **Plano de Gestão da Região Hidrográfica do Tejo**. Síntese para consulta pública - versão extensa.
- Ahel, M., Ginger, W., Koch, M. (1994). **Behaviour of alkylphenol ethoxylates surfactants in the aquatic environment. 1. Occurrence and transformation in sewage treatment.** *Water Research*, 28, 1131.
- Allison, D. G. (2003). **The biofilme matrix.** *Biofouling: The Journal of Bioadhesion and Biofilm Research*, 19(2), 139-150.
- American Public Health Association (APHA) (2005). **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**. 21st Edition.
- Américo, J. H., Messias, T., Torres, N., & Américo, G. H. (2012). **Desreguladores endócrinos no ambiente e seus efeitos na biota e saúde humana.** *Pesticidas: R.ecotoxicol. E Meio Ambiente*, 22, 17–34.
- Baltussen, E., Sandra, P., Frank, D., Cramers, C. (1999). **Stir Bar Sorptive Extraction (SBSE), a novel extraction technique for aqueous samples: theory and principles.** *J. Microcol.* 737-747.
- Barbosa, M., Moreira, N., Ribeiro, A., Pereira, M. (2016). **Occurance and removal of organic micropollutants: na overview of the watch list of EU decision 2015/495.** *Water Research*, 94, 257-279.
- Beausse, J. (2004). **Selected drugs in solid matrices: a review of environmental determination, occurrence and properties of principal substances.** *Trends in Analytical Chemistry*, 23, 753-761.
- Bialk-Bielinska, A., Kumirska, J., Palavinskas, R., Stepnowski, P. (2009). **Optimization of multiple reaction monitoring mode for the trace analysis of veterinary sulfonamides by LC-MS/MS.** *Talanta*, 80(2), 947-953.
- Bila, D. M., & Dezotti, M. (2007). **Desreguladores Endócrinos no Meio Ambiente: Efeitos e Consequências.** *Química Nova*, 30(3), 651–666.
- Bolong, N., Ismail, A. F., Salim, M. R., Matsuura, T. (2009). **A review of the effects of emerging contaminants in wastewater and options for their removal.** *Desalination*, 239, 229-246.
- Campani, D., Marques, D., Müller, G., Centeno, G. (2010). **Esteróides em águas residuárias – Estado da Arte e Perspectivas de Tratamento.** VII Simpósio Internacional de Qualidade Ambiental. Brasil.
- Castro-Correia, C., & Fontoura, M. (2015). **A influência da exposição ambiental a disruptores endócrinos no crescimento e desenvolvimento de crianças e adolescentes.** *Revista Portuguesa de Endocrinologia, Diabetes E Metabolismo*, 10(2), 186–192.
- Chambel, J. H. (2011). **Contribuição para o estudo da remoção em ETAR de 17 β -estradiol e de 17 α -etinilestradiol no tratamento biológico.** Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia do Ambiente, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa.
- Characklis, W. & Marshall, K. (1989). **Biofilms.** John Wiley, New York.

- Colborn, T., Saal, F. S., & Soto, A. M. (1993). **Developmental Effects of Endocrine-Disrupting Chemicals in Wildlife and Humans**. *Environmental Health Perspectives*, 101(5).
- Dang, J. S., Harvey, D. M., Jobbagy, A., Grady Jr., C. P. L. (1989). **Evaluation of biodegradation kinetics with respirometric data**. *Research Journal of the Water Pollution Control Federation*, 61(11-12), 1711-1721.
- Davis, M. L. (2010). **Water and wastewater engineering - Design principles and practice**. McGraw-Hill Education, 24-12; 24-13.
- Domingos, I. J., (1999). **Contribuição para o Estudo da Biodegradação Aeróbia de Ácido Abiético e Terpeneol**. Dissertação para obtenção do Grau de Doutor, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa.
- Duarte, P. A. (2008). **Novos poluentes. Principais impactes de compostos desreguladores endócrinos na saúde pública**. Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa.
- Farré, M., Pérez, S., Kantiani, L. (2008). **Fate and toxicity of emerging pollutants, their metabolites and transformation products in the aquatic environment**. *Trends in Analytical Chemistry*, 27(11), 991-1007.
- Fernandes, S. (2016). **Contribuição para o Estudo da Remoção Biológica de 17 β -estradiol em Águas Residuais**. Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia do Ambiente, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa.
- Flores-Valverde, A. M., Horwood, J., & Hill, E. M. (2010). **Disruption of the Steroid Metabolome in Fish Caused by Exposure to the Environmental Estrogen 17 α -Ethinylestradiol**. *Environmental Science & Technology*, 44(9), 3552–3558.
- Foster, W. (1998). **Endocrine disruptors & Development of the reproductive system in the fetus and children: is there cause for concern?**. *Canadian Journal of Public Health*. 89(1), 37-41.
- Gaffney, V., Cardoso, V., Rodrigues, A., Ferreira, E., Benoliel, M. J., & Almeida, C. M. (2014). **Análise de fármacos em águas por SPE-UPLC-ESI-MS/MS**. *Química Nova*, 37(1), 138–149.
- Gómez, M., Herrera, S., Solé, D., García-Calvo, E., Fernández-Alba, A. (2011). **Automatic searching and evaluation of priority and emerging contaminants in wastewater and river water by stir bar sorptive extraction followed by comprehensive two-dimensional gas chromatography-time-of-flight mass spectrometry**. *Analytical Chemistry*, 83(7), 2638-2647.
- Henriques, M. L. (2008). **Hormonas naturais e de síntese, bisfenol A, octilfenol e nonilfenol em águas para consumo humano: optimização do método de análise por SPE-LC-ESI-MS/MS**. Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Controlo da Qualidade e Toxicologia dos Alimentos. Faculdade de Farmácia. Universidade de Lisboa.
- Huang, C. H. & Sedlak, D. L. (2001). **Analysis of estrogenic hormones in municipal wastewater effluent and surface water using enzyme-linked immunosorbent assay and gas chromatography / tandem mass spectrometry**. *Environmental Toxicology Chemistry*, 20,133.
- Huber, L., (2007), **Validation and Qualification in Analytical Laboratories**, Interpharm, Informa Healthcare, New York, USA.
<https://www.agilent.com/cs/library/primers/Public/5990-5140EN.pdf>
- Ifelebuegu, A. O. (2011). **The fate and behavior of selected endocrine disrupting chemicals**

- in full scale wastewater and sludge treatment unit processes.** *International Journal of Environmental Science and Technology*, 8(2), 245–254.
- Institute for Environment and Health - IEH. (1995). **Environmental oestrogens: consequences to human health and wildlife.** University of Leicester, UK.
- International Conference on Harmonization (ICH) of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use, (1996), **Validation of analytical procedures: Text and Methodology**, ICH-Q2B, Geneva.
http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1_Guideline.pdf
- Irwin, L., Gray, S., Oberdörster, E. (2001). **Vitellogenin induction in painted turtle, *Chrysemys picta*, as a biomarker of exposure to environmental levels of estradiol.** *Aquatic Toxicology*, 55, 49-60.
- Johnsen, A. R. & Karlson, U. (2007). **Diffuse PAH contamination of surface soils: environmental occurrence, bioavailability, and microbial degradation.** *Applied Microbiology and Biotechnology*, 76(3), 533-543.
- Johnson, A. C., Belfroid, A., Di Corcia, A. D. (2000). **Estimating steroid oestrogen inputs into activated sludge treatment works and observations on their removal from the effluente.** *The Science Total Environmental*, 256(2-3), 163-173.
- Koh, Y. K. K., Chiu, T. Y., Boobis, A., Cartmell, E., Scrimshaw, M. D., & Lester, J. N. (2008). **Treatment and removal strategies for estrogens from wastewater.** *Environmental Technology*, 29(3), 245–267.
- Laurenson, J. P., Bloom, R. A., Page, S., & Sadrieh, N. (2014). **Ethinyl Estradiol and Other Human Pharmaceutical Estrogens in the Aquatic Environment: A Review of Recent Risk Assessment Data.** *The AAPS Journal*, 16(2), 299–310.
- Lee, J., Lee, B. C., Ra, J. S., Cho, J., Kim, I. S. Chang, N. I., Kim, H. K., Kim, S. D. (2008). **Comparison of the removal efficiency of endocrine disrupting compounds in pilot scale sewage treatment processes.** *Chemosphere*, 71, 1582–1592.
- Machado, K. (2010). **Determinação de hormônios sexuais femininos na bacia do Alto Iguaçu, região metropolitana de Curitiba-PR.** Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Recursos Hídricos e Ambiental, Universidade Federal do Paraná.
- Machado, S. M. (2005). **Avaliação do efeito antimicrobiano do surfactante cloreto de benzalcônio no controlo da formação de biofilme indesejáveis.** Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Tecnologia do Ambiente, Universidade do Minho.
- Metcalf & Eddy (2003). **Wastewater Engineering – Treatment and Reuse.** McGraw-Hill. 4th Edition. New York, EUA.
- Morris, S. & Lester, J. (1994). **Behaviour and fate of polychlorinated biphenyls in a pilot wastewater treatment plant.** *Water Research*, 28, 1553.
- Nassif, M., Cimarosti, H., Zamin, L., Salbego, C. (2005). **Estrógeno versus isquemia cerebral: hormônio feminino como agente neuroprodutor.** *Infarma*, 17, 57-65.
- Nogueira, J. M. (1999). **Desreguladores Endócrinos: Efeitos Adversos e Estratégias para Monitorização dos Sistemas Aquáticos.** *European Journal of Inorganic Chemistry*, 65–72.
- Nogueira, J. M. (2012). **Extração Sortiva em Barra de Agitação (SBSE): uma metodologia inovadora para microextração estática.** *Scientia Chromatographica*, 4(4), 259–269.

- Panther, G., Thompson, R., Sumpter, J. (1998). **Adverse reproductive effects in male fathead Minnows (*Pimephales promelas*) exposed to environmentally relevant concentrations of the natural oestrogens, oestradiol and oestrone.** *Aquatic Toxicology*, 42, 243-253.
- Pintado-Herrera, M. G., González-Mazo, E., & Lara-Martín, P. A. (2014). **Atmospheric pressure gas chromatography-time-of-flight-mass spectrometry (APGC-ToF-MS) for the determination of regulated and emerging contaminants in aqueous samples after stir bar sorptive extraction (SBSE).** *Analytica Chimica Acta*, 851, 1–13.
- Queiroz, M. E. (2009). **Extração sortiva em barra de agitação (SBSE): Fundamentos teóricos e fases seletivas.** *Scientia Chromatographica*, 1, 21–29.
- Rangel, J.F. (2010). **Análise quantitativa de monómeros existentes na saliva através de técnicas cromatográficas.** Dissertação para obtenção de grau de Mestre em Medicina Dentária, Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz.
- Reis Filho, R. W., Araújo, J., & Vieira, E. M. (2006). **Hormônios sexuais estrógenos: contaminantes bioativos.** *Química Nova*, 29(4), 817–822.
- Rodrigues, R. M. (2009). **Contribuição para o estudo de biofilmes de espessura controlada - Idade do biofilme.** Dissertação para obtenção do Grau de Doutor em Engenharia Sanitária, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa.
- Rolim, M. (2014). **Contribuição para o estudo da caracterização de biofilmes de diferentes idades.** Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia do Ambiente, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa.
- Roque, A. L. (2009). **Remoção de compostos farmacêuticos persistentes das águas - Efeitos no ambiente e na saúde humana.** Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia do Ambiente, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa.
- Rosa, R. M. (2008). **Contribuição para o estudo de compostos desreguladores endócrinos (EDC) em estações de tratamento de águas residuais (ETAR): Estudo da remoção de EDC's numa ETAR com tratamento terciário.** Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia do Ambiente, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa.
- Russo, D. A. (2011). **Estudo do crescimento da microalga *Chlorella vulgaris* numa água residual tratada, sob diferentes condições de fotoperíodo e temperatura.** Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Energia e Bioenergia, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa.
- Salgado, R., Noronha, J. P., Oehmen, A., Carvalho, G., Reis, M. A. (2010). **Analysis of 65 pharmaceuticals and personal care products in 5 wastewater treatment plants in Portugal using a simplified analytical methodology.** *Water Science and Technology*, 62(12), 2862-2871.
- Saraiva, S. (2015). **Avaliação da eficiência da desinfecção de efluentes urbanos com recurso a cloro.** Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia do Ambiente, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa.
- Sarkar, S., & Mazumder, D. (2015). **Development of a simplified model for the fixed biofilm reactor.** *Water Science & Technology*, 72(9), 1601–1611.
- Schmid, T., Gonzalez-Valero, J., Rufli, H., Dietrich, D. R. (2002). **Determination of vitellogenin kinetics in male fathead minnows (*Pimephales promelas*).** *Toxicology Letters*, 131, 65-74.

- Shrivastava, A., & Gupta, V. B. (2011). **Methods for the determination of limit of detection and limit of quantitation of the analytical methods**, *Chronicles of Young Scientists*, 2(1), 21–25.
- Silva, S. M. (2007). **Padronização e validação do método extração sortiva em barra de agitação e cromatografia líquida de alta eficiência (SBSE/HPLC) para a determinação de antidepressivos em amostras de plasma**. Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Toxicologia, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.
- Ternes, T. A., Stumpf, M., Muefler, J., Haberer, K., Wilken, R., Servos, M. (1999) **Behaviour and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants – I. Investigation in German, Canada and Brazil**. *Science of the Total Environment*, 225(1-2), 81-90.
- Toppari, J., Larsen, J. C., Christiansen, P. (1995). **Male reproductive health and environmental chemicals with estrogenic effects**. *Copenhagen: Danish Environmental Protection Agency*. Miljøprojekt no. 290, 166.
- Vasiliadou, I. A., Molina, R., Martínez, F., & Melero, J. A. (2014). **Experimental and modeling study on removal of pharmaceutically active compounds in rotating biological contactors**. *Journal of Hazardous Materials*, 274, 473–482.
- Vicente, A. C. (2016). **Contribuição para o Estudo da Remoção do Fármaco 17 α - Etinilestradiol de Água Residual Urbana Tratada com Recurso ao Processo de Discos Biológicos**. Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia do Ambiente, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa.
- Wise, A., O'Brien, K., Woodruff, T. (2011). **Are Oral Contraceptives a Significant Contributor to the Estrogenicity of Drinking Water?**. *Environmental Science and Technology*, 45(1), 51-60.
- Yilmaz, B., & Kadioglu, Y. (2013). **Determination of 17 β -estradiol in pharmaceutical preparation by UV spectrophotometry and high performance liquid chromatography methods**. *Arabian Journal of Chemistry*. <http://doi.org/10.1016/j.arabjc.2013.04.018>

Sites Consultados:

http://ec.europa.eu/environment/chemicals/endocrine/definitions/life_en.htm (consultado a 14/06/2016)

<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/search?term=B-ESTRADIOL&interface=All&N=0&mode=match%20partialmax&lang=pt®ion=PT&focus=product> (Consultado a 06/09/2016)

http://www.sigmaaldrich.com/catalog/search?interface=All&term=ethinylestradiol&N=0&mode=match%20partialmax&focus=product&lang=pt®ion=PT&cm_re=Did%20You%20Mean_-_ethinylestradiol_-_ETINILESTRADIOL (Consultado a 06/09/2016)

Anexo I. Ficha de Segurança do Composto E2

SIGMA-ALDRICH

sigma-aldrich.com

FICHA DE DADOS DE SEGURANÇA

de acordo com a Regulamento (CE) No. 1907/2006

Versão 5.2 Data de revisão 21.08.2014

Data de impressão 23.10.2016

SECÇÃO 1: Identificação da substância/mistura e da sociedade/empresa**1.1 Identificadores do produto**

Nome do produto : B-ESTRADIOL

Referência do Produto : E8875

Marca : Sigma

No. REACH : Um número de registo não está disponível para esta substância, já que a substância ou os seus usos estão isentos do registo, a tonelagem anual não requiere registo ou este registo está previsto para uma data posterior

No. CAS : 50-28-2

1.2 Utilizações identificadas relevantes da substância ou mistura e utilizações desaconselhadas

Utilizações identificadas : Produtos químicos de laboratório, Fabrico de substâncias

1.3 Identificação do fornecedor da ficha de dados de segurança

Companhia : Sigma-Aldrich Química, S.L.
 Sucursal em Portugal
 Caixa Postal 131
 Av. Almirante Gago Coutinho,
 132-134,
 P-2711 901 SINTRA

Telefone : +351219242555

Número de Fax : +351219242610

Email endereço : eurtechserv@sial.com

1.4 Número de telefone de emergência

Número de Telefone de : +(351)-308801773 (CHEMTREC)
 Emergência

SECÇÃO 2: Identificação dos perigos**2.1 Classificação da substância ou mistura**

Classificação de acordo com el Regulamento (CE) 1272/2008

Carcinogenicidade (Categoria 2), H351

Toxicidade reprodutiva (Categoria 1A), H360Fd

Efeitos na ou por lactação, H362

Para o pleno texto das DECLARAÇÕES H mencionadas nesta Secção, ver a Secção 16.

Classificação de acordo com as Directivas da EU 67/548/CEE ou 1999/45/CE

T Tóxico R60, R40, R63, R64

Para o texto completo sobre as frases R mencionadas nesta Secção, ver a Secção 16.

2.2 Elementos do rótulo

Rotulagem de acordo com o Regulamento (CE) 1272/2008

Pictograma



Palavra-sinal

Perigo

Declaração de perigo	
H351	Suspeito de provocar cancro.
H360Fd	Pode afectar a fertilidade. Suspeito de afectar o nascituro.
H362	Pode ser nocivo para as crianças alimentadas com leite materno.
declaração de precaução	
P201	Pedir instruções específicas antes da utilização.
P263	Evitar o contacto durante a gravidez/ o aleitamento.
P281	Usar o equipamento de protecção individual exigido.
P308 + P313	EM CASO DE exposição ou suspeita de exposição: consulte um médico.
Declarações de Perigo Adicionais	nenhum(a)
Reservado aos utilizadores profissionais.	

2.3 Outros Perigos - nenhum(a)

SECÇÃO 3: Composição/informação sobre os componentes

3.1 Substâncias

Sinónimos	:	3,17β-Dihydroxy-1,3,5(10)-estratriene 1,3,5-Estratriene-3,17β-diol Dihydrofolliculin 17β-Estradiol
Formula	:	C ₁₈ H ₂₄ O ₂
Peso molecular	:	272,38 g/mol
No. CAS	:	50-28-2
No. CE	:	200-023-8

Ingredientes perigosos de acordo com o Regulamento (CE) N° 1272/2008

Componente	Classificação	Concentração
Estradiol		
No. CAS	50-28-2	Carc. 2; Repr. 1A; Lact. ; H351, H360Fd, H362
No. CE	200-023-8	
		<= 100 %

Ingrediente perigoso de acordo com a Directiva 1999/45/CE

Componente	Classificação	Concentração
Estradiol		
No. CAS	50-28-2	T, R60 - R40 - R63 - R64
No. CE	200-023-8	
		<= 100 %

Para ver o texto completo das frases de riscos e segurança mencionadas nesta secção, ver secção 16

SECÇÃO 4: Primeiros socorros

4.1 Descrição das medidas de primeiros socorros

Recomendação geral

Consultar um médico. Mostrar esta ficha de segurança ao médico de serviço.

Se for inalado

Se for respirado, levar a pessoa para o ar fresco. Se não respirar, dar respiração artificial. Consultar um médico.

No caso dum contacto com a pele

Lavar com sabão e muita água. Consultar um médico.

No caso dum contacto com os olhos

Lavar os olhos com água como precaução.

Se for engolido

Nunca dar nada pela boca a uma pessoa inconsciente. Enxaguar a boca com água. Consultar um médico.

4.2 Sintomas e efeitos mais importantes, tanto agudos como retardados

Os sintomas e efeitos mais importantes conhecidos descrevem-se na etiqueta (ver secção 2.2) e / ou na secção 11

4.3 Indicações sobre cuidados médicos urgentes e tratamentos especiais necessários dados não disponíveis

SECÇÃO 5: Medidas de combate a incêndios

5.1 Meios de extinção

Meios adequados de extinção

Utilizar água pulverizada, espuma resistente ao álcool, produto químico seco ou dióxido de carbono.

5.2 Perigos especiais decorrentes da substância ou mistura

Óxidos de carbono

5.3 Recomendações para o pessoal de combate a incêndios

Usar equipamento de respiração autónomo para combate a incêndios, se necessário.

5.4 Outras informações

dados não disponíveis

SECÇÃO 6: Medidas a tomar em caso de fugas acidentais

6.1 Precauções individuais, equipamento de protecção e procedimentos de emergência

Usar equipamento de protecção individual. Evitar a formação de poeira. Evitar a respiração do vapor/névoa/gas. Assegurar ventilação adequada. Evacuar o pessoal para áreas de segurança. Evitar de respirar o pó.

Para a protecção individual ver a secção 8.

6.2 Precauções a nível ambiental

Prevenir dispersão ou derramamento ulterior se for mais seguro assim. Não permitir a entrada do produto no sistema de esgotos.

6.3 Métodos e materiais de confinamento e limpeza

Apanhar os resíduos sem levantar poeiras. Varrer e apanhar com uma pá. Manter em recipientes fechados adequados, para eliminação.

6.4 Remissão para outras secções

Para eliminação de resíduos ver secção 13.

SECÇÃO 7: Manuseamento e armazenagem

7.1 Precauções para um manuseamento seguro

Evitar a exposição - obter instruções específicas antes da utilização. Evitar o contacto com a pele e os olhos. Evitar a formação de pó e aerossóis.

Providenciar uma adequada ventilação em locais onde se formem poeiras.

Ver precauções na secção 2.2

7.2 Condições de armazenagem segura, incluindo eventuais incompatibilidades

Armazenar em local fresco. Guardar o recipiente herméticamente fechado em lugar seco e bem ventilado.

7.3 Utilizações finais específicas

Aparte dos usos mencionados na secção 1.2 não se estipulam outros usos específicos

SECÇÃO 8: Controlo da exposição/protecção individual

8.1 Parâmetros de controlo

Componentes a controlar com relação ao local de trabalho

Não contem substâncias com valores limites de exposição profissional.

8.2 Controlo da exposição

Controlos técnicos adequados

Manusear de acordo com as boas práticas industriais de higiene e segurança. Lavar as mãos antes de interrupções, e no final do dia de trabalho.

Protecção individual

Protecção ocular/ facial

Óculos de protecção com um lado protector de acordo com EN 166 Use equipamento de protecção ocular testado e aprovado de acordo com as normas governamentais adequadas, tais como NIOSH (US) ou EN 166 (EU).

Protecção da pele

Manusear com luvas. As luvas devem ser inspectadas antes da utilização. Use uma técnica adequada para a remoção das luvas (sem tocar a superfície exterior da luva) para evitar o contacto da pele com o produto. Descarte as luvas contaminadas após o uso, em conformidade com as leis e boas práticas de laboratório. Lavar e secar as mãos.

As luvas de protecção seleccionadas devem satisfazer as especificações da Directiva da UE 89/689/CEE e a norma EN 374 derivada dela.

Contacto total

Substância: Borracha de nitrilo
espessura mínima da capa: 0,11 mm
Pausa através do tempo: 480 min

Material ensaiado: Dermatrill® (KCL 740 / Aldrich Z677272, Tamanho M)

Contacto com salpicos

Substância: Borracha de nitrilo
espessura mínima da capa: 0,11 mm
Pausa através do tempo: 480 min

Material ensaiado: Dermatrill® (KCL 740 / Aldrich Z677272, Tamanho M)

fonte de dados: KCL GmbH, D-36124 Eichenzell, Telefone +49 (0)6659 87300, e-mail sales@kcl.de, Método de ensaio: EN374

Se for utilizado em solução, ou misturado com outras substâncias, e sob condições que diferem da EN 374, contactar o fornecedor de luvas da CE. Esta recomendação é apenas desejável e deve ser avaliada por um responsável de segurança e higiene industrial familiarizado com a situação específica de utilização pretendida pelos nossos clientes. Não deve ser interpretado como uma oferta de aprovação para qualquer cenário de uso específico

Protecção do corpo

roupas impermeáveis, O genero de equipamento de protecção deve ser escolhido de acordo com a concentração e a quantidade da substância perigosa no lugar de trabalho.

Protecção respiratória

Nos casos em que a avaliação de risco mostrar que os respiradores purificadores do ar são apropriados, use um respirador de partículas do tipo N100 (E.U.A.) ou cartuchos de respiração do tipo P2 (EN 143) como apoio a controlos de engenharia. Se o respirador for o único meio de protecção, usa um respirador de ar de cobertura facial total. Use respiradores e componentes testados e aprovados por normas governamentais apropriadas, tais como as NIOSH (E.U.A.) ou CEN (UE).

Controlo da exposição ambiental

Prevenir dispersão ou derramamento ulterior se for mais seguro assim. Não permitir a entrada do produto no sistema de esgotos.

SECÇÃO 9: Propriedades físicas e químicas

9.1 Informações sobre propriedades físicas e químicas de base

- | | |
|------------|--------------------------|
| a) Aspecto | Forma: pó
Cor: branco |
| b) Odor | dados não disponíveis |

c)	Limiar olfactivo	dados não disponíveis
d)	pH	dados não disponíveis
e)	Ponto de fusão/ponto de congelação	Ponto/intervalo de fusão: 176 - 180 °C - lit.
f)	Ponto de ebulição inicial e intervalo de ebulição	dados não disponíveis
g)	Ponto de inflamação	dados não disponíveis
h)	Taxa de evaporação	dados não disponíveis
i)	Inflamabilidade (sólido, gás)	dados não disponíveis
j)	limites de inflamabilidade superior / inferior ou explosivos	dados não disponíveis
k)	Pressão de vapor	dados não disponíveis
l)	Densidade de vapor	dados não disponíveis
m)	Densidade relativa	dados não disponíveis
n)	Hidrossolubilidade	dados não disponíveis
o)	Coefficiente de partição n-octanol/água	dados não disponíveis
p)	Temperatura de auto-ignição	dados não disponíveis
q)	Temperatura de decomposição	dados não disponíveis
r)	Viscosidade	dados não disponíveis
s)	Propriedades explosivas	dados não disponíveis
t)	Propriedades comburentes	dados não disponíveis
9.2	Outra informação de segurança	dados não disponíveis

SECÇÃO 10: Estabilidade e reactividade

- 10.1 Reactividade
dados não disponíveis
- 10.2 Estabilidade química
Estável sob as condições recomendadas de armazenamento.
- 10.3 Possibilidade de reacções perigosas
dados não disponíveis
- 10.4 Condições a evitar
dados não disponíveis
- 10.5 Materiais incompatíveis
Agentes oxidantes fortes
- 10.6 Produtos de decomposição perigosos
Outros produtos de decomposição perigosos - dados não disponíveis
Em caso de incêndio: veja-se secção 5

SECÇÃO 11: Informação toxicológica**11.1 Informações sobre os efeitos toxicológicos****Toxicidade aguda**

dados não disponíveis

Corrosão/irritação cutânea

dados não disponíveis

Lesões oculares graves/irritação ocular

dados não disponíveis

Sensibilização respiratória ou cutânea

dados não disponíveis

Mutagenicidade em células germinativas

ratazana

Outros tipos celulares

Danificação do DNA

ratazana

Transformação morfológica.

Carcinogenicidade

O programa Nacional de Toxicologia (decima reportagem de carcinogêneos) determinou que os estrógenos esteroidais são conhecidos como carcinogêneos humanos baseando-se em evidências suficientes de carcinogenicidade em humanos o qual indica uma relação causa/efeito entre exposição a estrógenos esteroidais e cancro em humanos. Este produto é ou contém um componente que foi relatado como sendo carcinogénico segundo sua classificação pela IARC, OSHA, ACGIH, NTP ou EPA.

Carcinogénos suspeitos para os humanos

IARC: Nenhum componente deste produto presente a níveis maiores ou iguais a 0.1% é identificado como carcinogénio provável, possível ou confirmado pelo IARC.

Toxicidade reprodutiva

Tóxico reprodutivo suspeito para os humanos Prejuízos para o feto não podem ser excluídos.

Tóxico reprodutivo conhecido para os humanos Efeitos na ou por lactação Pode afectar a fertilidade.

Suspeito de afectar o nascituro.

Toxicidade para órgãos-alvo específicos - exposição única

dados não disponíveis

Toxicidade para órgãos-alvo específicos - exposição repetida

dados não disponíveis

Perigo de aspiração

dados não disponíveis

Informação adicional

RTECS: KG2975000

Até onde sabemos, as propriedades químicas, físicas e toxicológicas não foram minuciosamente investigadas.

Fígado - Irregularidades - Baseado na prova sobre os humanos

SECÇÃO 12: Informação ecológica**12.1 Toxicidade**

Toxicidade em peixes CL50 - *Oncorhynchus mykiss* (truta arco-íris) - > 0,5 mg/l - 96 h

12.2 Persistência e degradabilidade

dados não disponíveis

- | | |
|------|--|
| 12.3 | Potencial de bioacumulação
dados não disponíveis |
| 12.4 | Mobilidade no solo
dados não disponíveis |
| 12.5 | Resultados da avaliação PBT e mPMB
A valoração de PBT / mPMB não está disponível já que a avaliação de segurança química não é necessária / não se realizou |
| 12.6 | Outros efeitos adversos |

SECÇÃO 13: Considerações relativas à eliminação

13.1 Métodos de tratamento de resíduos

Produto

Propor a entrega de soluções excedentes e não recicláveis a uma empresa idônea de tratamento de resíduos. Dissolver ou misturar o material com um solvente combustível e queimar em incinerador químico equipado com pós-combustor e purificador de gases.

Embalagens contaminadas

Eliminar como produto Não utilizado.

SECCÃO 14: Informações relativas ao transporte

14.1 Número ONU

ADR/RID: - IMDG: - IATA: -

14.2 Designação oficial de transporte da ONU

ADR/RID: Mercadorias não perigosas
IMDG: Not dangerous goods
IATA: Not dangerous goods

14.3 Classes de perigo para efeitos de transporte

ADR/RID: - IMDG: - IATA: -

14.4 Grupo de embalagem

ADR/RID: - IMDG: - IATA: -

14.5 Perigos para o ambiente

ADR/RID: não IMDG Marine pollutant: no IATA: no

14.6 Precauções especiais para o utilizador

dados não disponíveis

SECÇÃO 15: Informação sobre regulamentação

Esta folha de dados de segurança obedece aos requerimentos da Regulamento (CE) No. 1907/2006

15.1 Regulamentação/legislação específica para a substância ou mistura em matéria de saúde, segurança e ambiente

dados não disponíveis

15.2 Avaliação da segurança química

Para este produto não se realizou uma avaliação de segurança química

SEÇÃO 16: Outras informações

Texto integral das declarações H referidas nos parágrafos 2 e 3.

Carc.	Carcinogenicidade
H351	Suspeito de provocar cancro.
H360Fd	Pode afectar a fertilidade. Suspeito de afectar o nascituro.
H362	Pode ser nocivo para as crianças alimentadas com leite materno.

Lact.	Efeitos na ou por lactação
Repr.	Toxicidade reprodutiva

Texto integral das frases R referidas nos pontos 2 e 3

T	Tóxico
R40	Possibilidade de efeitos cancerígenos.
R60	Pode comprometer a fertilidade.
R63	Possíveis riscos durante a gravidez com efeitos adversos na descendência.
R64	Pode causar danos às crianças alimentadas com leite materno.

Outras informações

Direitos exclusivos, 2014, da Sigma-Aldrich Co. LLC. Permissão concedida para fazer número ilimitado de cópias em papel, somente para uso interno.

Acredita-se que as informações acima estejam correctas, embora não pretendam ser totalmente abrangentes, devendo ser usadas apenas como um guia. A informação contida neste documento esta baseada no presente estado do nosso conhecimento e é aplicável às precauções de segurança apropriadas para o produto. Não representa nenhuma garantia das propriedades do produto. A Corporação Sigma-Aldrich e as suas companhias afiliadas, não responderão por nenhum dano resultante do manuseio ou do contato com o produto acima. Consultar www.sigma-aldrich.com e/ou o verso da factura ou nota que acompanha o produto para tomar conhecimento dos termos adicionais e condições de venda.

Anexo II. Ficha de Segurança do Composto EE2

SIGMA-ALDRICH

sigma-aldrich.com

FICHA DE DADOS DE SEGURANÇA

de acordo com a Regulamento (CE) No. 1907/2006

Versão 5.2 Data de revisão 13.11.2012

Data de impressão 23.10.2016

1. IDENTIFICAÇÃO DA SUBSTÂNCIA/MISTURA E DA SOCIEDADE/EMPRESA**1.1 Identificadores do produto**

Nome do produto : 17A-ETINILESTRADIOL

Referência do Produto : E4876

Marca : Sigma

No. CAS : 57-63-6

1.2 Utilizações identificadas relevantes da substância ou mistura e utilizações desaconselhadas

Utilizações identificadas : Produtos químicos de laboratório, Fabrico de substâncias

1.3 Identificação do fornecedor da ficha de dados de segurança

Companhia : Sigma-Aldrich Química, S.L.
 Sucursal em Portugal
 Caixa Postal 131
 Av. Almirante Gago Coutinho,
 132-134,
 P-2711 901 SINTRA

Telefone : +351219242555

Número de Fax : +351219242610

Email endereço : eurtechserv@sial.com

1.4 Número de telefone de emergência

Número de Telefone de : +(351)-308801773 (CHEMTREC)
 Emergência

2. IDENTIFICAÇÃO DOS PERIGOS**2.1 Classificação da substância ou mistura**

Classificação de acordo com el Regulamento (CE) 1272/2008 [UE-GHS/CLP]

Toxicidade aguda, Oral (Categoria 4)

Carcinogenicidade (Categoria 1B)

Classificação de acordo com as Directivas da EU 67/548/CEE ou 1999/45/CE

Pode causar cancro. Nocivo por ingestão.

2.2 Elementos da etiqueta

Rotulagem de acordo com o Regulamento (CE) 1272/2008 [UE-GHS/CLP]

Pictograma



Palavra-sinal

Perigo

Declaração de perigo

H302

Nocivo por ingestão.

H350

Pode provocar cancro.

declaração de precaução

P201

Pedir instruções específicas antes da utilização.

P308 + P313

EM CASO DE exposição ou suspeita de exposição: consulte um médico.

Declarações de Perigo

nenhum(a)

Adicionais

Reservado aos utilizadores profissionais.

De acordo com a directiva Europeia 67/548/CEE, e emendas.
símbolo de perigosidade



Frase(s) - R

R45

Pode causar cancro.

R22

Também nocivo por ingestão.

Frase(s) - S

S53

Evitar a exposição - obter instruções específicas antes da utilização.

S45

Em caso de acidente ou de indisposição, consultar imediatamente o médico (se possível mostrar-lhe o rótulo).

S36/37/39

Usar vestuário de protecção, luvas e equipamento protector para os olhos/face adequados.

Reservado aos utilizadores profissionais.

2.3 Outros Perigos - nenhum(a)

3. COMPOSIÇÃO/ INFORMAÇÃO SOBRE OS COMPONENTES

3.1 Substâncias

Sinónimos

: 17 α -Ethinyl-1,3,5(10)-estratriene-3,17 β -diol
19-Nor-1,3,5(10),17 α -pregnatrien-20-yne-3,17-diol
Ethinylestradiol

Formula

: C₂₀H₂₄O₂

Peso molecular

: 296,40 g/mol

Componente		Concentração
17 α -Ethinylestradiol		
No. CAS	57-63-6	-
No. CE	200-342-2	

4. PRIMEIROS SOCORROS

4.1 Descrição das medidas de primeiros socorros

Recomendação geral

Consultar um médico. Mostrar esta ficha de segurança ao médico de serviço.

Se for inalado

Se for respirado, levar a pessoa para o ar fresco. Se não respirar, dar respiração artificial. Consultar um médico.

No caso dum contacto com a pele

Lavar com sabão e muita água. Consultar um médico.

No caso dum contacto com os olhos

Lavar os olhos com água como precaução.

Se for engolido

Nunca dar nada pela boca a uma pessoa inconsciente. Enxaguar a boca com água. Consultar um médico.

4.2 Sintomas e efeitos mais importantes, tanto agudos como retardados

4.3 Indicações sobre cuidados médicos urgentes e tratamentos especiais necessários dados não disponíveis

5.	MEDIDAS DE COMBATE A INCÊNDIOS
5.1	Meios de extinção Meios adequados de extinção Utilizar água pulverizada, espuma resistente ao álcool, produto químico seco ou dióxido de carbono.
5.2	Perigos especiais decorrentes da substância ou mistura Óxidos de carbono
5.3	Recomendações para o pessoal de combate a incêndios Usar equipamento de respiração autónomo para combate a incêndios, se necessário.
5.4	Outras informações dados não disponíveis
6.	MEDIDAS A TOMAR EM CASO DE FUGAS ACIDENTAIS
6.1	Precauções individuais, equipamento de protecção e procedimentos de emergência Usar equipamento de protecção individual. Evitar a formação de poeira. Evitar a respiração do vapor/névoa/gas. Assegurar ventilação adequada. Evacuar o pessoal para áreas de segurança. Evitar de respirar o pó.
6.2	Precauções a nível ambiental Prevenir dispersão ou derramamento ulterior se for mais seguro assim. Não permitir a entrada do produto no sistema de esgotos. A descarga no meio ambiente deve ser evitada.
6.3	Métodos e materiais de confinamento e limpeza Apanhar os resíduos sem levantar poeiras. Varrer e apanhar com uma pá. Manter em recipientes fechados adequados, para eliminação.
6.4	Remissão para outras secções Para eliminação de resíduos ver secção 13.
7.	MANUSEAMENTO E ARMAZENAGEM
7.1	Precauções para um manuseamento seguro Evitar o contacto com a pele e os olhos. Evitar a formação de pó e aerossóis. Evitar a exposição - obter instruções específicas antes da utilização. Providenciar uma adequada ventilação em locais onde se formem poeiras. Medidas usuais de protecção preventiva contra incêndio.
7.2	Condições de armazenagem segura, incluindo eventuais incompatibilidades Armazenar em local fresco. Guardar o recipiente herméticamente fechado em lugar seco e bem ventilado. Sensível à luz.
7.3	Utilizações finais específicas dados não disponíveis
8.	CONTROLO DA EXPOSIÇÃO/ PROTECÇÃO INDIVIDUAL
8.1	Parâmetros de controlo Componentes a controlar com relação ao local de trabalho Não contem substâncias com valores limites de exposição profissional.
8.2	Controlo da exposição Controlos técnicos adequados Manusear de acordo com as boas práticas industriais de higiene e segurança. Lavar as mãos antes de interrupções, e no final do dia de trabalho. Protecção individual Protecção ocular/ facial Óculos de protecção com um lado protector de acordo com EN 166 Use equipamento de protecção ocular testado e aprovado de acordo com as normas governamentais adequadas, tais como NIOSH (US) ou EN 166 (EU).

Protecção da pele

Manusear com luvas. As luvas devem ser inspectadas antes da utilização. Use uma técnica adequada para a remoção das luvas (sem tocar a superfície exterior da luva) para evitar o contacto da pele com o produto. Descarte as luvas contaminadas após o uso, em conformidade com as leis e boas práticas de laboratório. Lavar e secar as mãos.

As luvas de protecção seleccionadas devem satisfazer as especificações da Directiva da UE 89/689/CEE e a norma EN 374 derivada dela.

Protecção do corpo

Fato completo de protecção para produtos químicos, O género de equipamento de protecção deve ser escolhido de acordo com a concentração e a quantidade da substância perigosa no lugar de trabalho.

Protecção respiratória

Nos casos em que a avaliação de risco mostrar que os respiradores purificadores do ar são apropriados, use um respirador de partículas do tipo N100 (E.U.A.) ou cartuchos de respiração do tipo P2 (EN 143) como apoio a controlos de engenharia. Se o respirador for o único meio de protecção, usa um respirador de ar de cobertura facial total. Use respiradores e componentes testados e aprovados por normas governamentais apropriadas, tais como as NIOSH (E.U.A.) ou CEN (UE).

9. PROPRIEDADES FÍSICAS E QUÍMICAS

9.1 Informações sobre propriedades físicas e químicas de base

a) Aspecto	Forma: sólido
b) Odor	dados não disponíveis
c) Limiar olfactivo	dados não disponíveis
d) pH	dados não disponíveis
e) Ponto de fusão/ponto de congelação	Ponto/intervalo de fusão: 182 - 183 °C - lit.
f) Ponto de ebulição inicial e intervalo de ebulição	dados não disponíveis
g) Ponto de inflamação	não aplicável dados não disponíveis
h) Taxa de evaporação	dados não disponíveis
i) Inflamabilidade (sólido, gás)	dados não disponíveis
j) limites de inflamabilidade superior / inferior ou explosivos	dados não disponíveis
k) Pressão de vapor	dados não disponíveis
l) Densidade de vapor	dados não disponíveis
m) Densidade relativa	dados não disponíveis
n) Hidrossolubilidade	dados não disponíveis
o) Coeficiente de partição n-octanol/água	dados não disponíveis
p) Temperatura de auto-ignição	dados não disponíveis
q) Temperatura de decomposição	dados não disponíveis
r) Viscosidade	dados não disponíveis
s) Propriedades explosivas	dados não disponíveis

t)	Propriedades combustíveis	dados não disponíveis
9.2	Outra informação de segurança	dados não disponíveis
<hr/>		
10.	ESTABILIDADE E REACTIVIDADE	
10.1	Reactividade	dados não disponíveis
10.2	Estabilidade química	dados não disponíveis
10.3	Possibilidade de reacções perigosas	dados não disponíveis
10.4	Condições a evitar	dados não disponíveis
10.5	Materiais incompatíveis	Agentes oxidantes fortes
10.6	Produtos de decomposição perigosos	Outros produtos de decomposição perigosos - dados não disponíveis
<hr/>		
11.	INFORMAÇÃO TOXICOLÓGICA	
11.1	Informações sobre os efeitos toxicológicos	
	Toxicidade aguda DL50 Oral - ratazana - 960 mg/kg	
	Corrosão/irritação cutânea dados não disponíveis	
	Lesões oculares graves/irritação ocular dados não disponíveis	
	Sensibilização respiratória ou cutânea dados não disponíveis	
	Mutagenicidade em células germinativas dados não disponíveis	
	Carcinogenicidade Há provas suficientes da carcinogenicidade do etinilestradiol em animais experimentais. Na ausência de dados adequados em seres humanos, é razoável, para fins práticos, que se considere o etinilestradiol como se apresentasse um risco carcinogénico para os seres humanos. Os estudos em seres humanos sugerem vivamente que a administração de estrogénios está casualmente relacionada com uma incidência aumentada de carcinoma endometrial; não há provas de que o etinilestradiol seja diferente de outros estrogénios a este respeito. Carcinogénio humano possível	
	IARC: Nenhum componente deste produto presente a níveis maiores ou iguais a 0.1% é identificado como carcinogénio provável, possível ou confirmado pelo IARC.	
	Toxicidade reprodutiva As experiências no laboratório mostraram efeitos teratogénicos Tendo em base experimentos com animais de laboratório, a exposição excessiva pode provocar desordem(ns) reprodutiva(s).	
	Toxicidade para órgãos-alvo específicos - exposição única dados não disponíveis	

Toxicidade para órgãos-alvo específicos - exposição repetida
dados não disponíveis

Perigo de aspiração
dados não disponíveis

Efeitos potenciais para a saúde

Inalação	Pode ser perigoso se for inalação. Pode causar uma irritação do aparelho respiratório.
Ingestão	Nocivo por ingestão.
Pele	Pode ser perigoso se for absorvido pela pele. Pode causar uma irritação da pele.
Olhos	Pode causar uma irritação dos olhos.

Informação adicional
RTECS: RC8925000

12. INFORMAÇÃO ECOLÓGICA

12.1 Toxicidade

12.2 Persistência e degradabilidade

dados não disponíveis

12.3 Potencial de bioacumulação

dados não disponíveis

12.4 Mobilidade no solo

dados não disponíveis

12.5 Resultados da avaliação PBT e mPmB

dados não disponíveis

12.6 Outros efeitos adversos

Muito tóxico para os organismos aquáticos com efeitos duradouros.
dados não disponíveis

13. CONSIDERAÇÕES RELATIVAS À ELIMINAÇÃO

13.1 Métodos de tratamento de resíduos

Produto

Propor a entrega de soluções excedentes e não recicláveis a uma empresa idónea de tratamento de resíduos. Entrar em contato com um serviço profissional credenciado de descarte de lixo para descartar esse material. Dissolver ou misturar o material com um solvente combustível e queimar em incinerador químico equipado com pós-combustor e purificador de gases.

Embalagens contaminadas

Eliminar como produto Não utilizado.

14. INFORMAÇÕES RELATIVAS AO TRANSPORTE

14.1 Número ONU

ADR/RID: 3077 IMDG: 3077 IATA: 3077

14.2 Designação oficial de transporte da ONU

ADR/RID: MATÉRIA PERIGOSA DO PONTO DE VISTA DO AMBIENTE, SÓLIDA, N.S.A. (17α-Ethynylestradiol)

IMDG: ENVIRONMENTALLY HAZARDOUS SUBSTANCE, SOLID, N.O.S. (17α-Ethynylestradiol)

IATA: Environmentally hazardous substance, solid, n.o.s. (17α-Ethynylestradiol)

14.3 Classes de perigo para efeitos de transporte

ADR/RID: 9 IMDG: 9 IATA: 9

14.4 Grupo de embalagem

ADR/RID: III IMDG: III IATA: III

14.5 Perigos para o ambiente

ADR/RID: sim

IMDG Marine pollutant: yes

IATA: yes

14.6 Precauções especiais para o utilizador

Outras informações

Marca-EHS requerida (códigos ADR 2.2.9.1.10 e IMDG 2.10.3) para embalagens únicas e embalagens combinadas que contenham embalagens interiores com Mercadorias Perigosas > 5L para líquidos ou > 5Kg para sólidos.

15. INFORMAÇÃO SOBRE REGULAMENTAÇÃO

Esta folha de dados de segurança obedece aos requerimentos da Regulamento (CE) No. 1907/2006

15.1 Regulamentação/legislação específica para a substância ou mistura em matéria de saúde, segurança e ambiente
dados não disponíveis

15.2 Avaliação da segurança química
dados não disponíveis

16. OUTRAS INFORMAÇÕES

Outras informações

Direitos exclusivos, 2012, da Sigma-Aldrich Co. LLC. Permissão concedida para fazer número ilimitado de cópias em papel, somente para uso interno.

Acredita-se que as informações acima estejam correctas, embora não pretendam ser totalmente abrangentes, devendo ser usadas apenas como um guia. A informação contida neste documento esta baseada no presente estado do nosso conhecimento e é aplicável às precauções de segurança apropriadas para o produto. Não representa nenhuma garantia das propriedades do produto. A Corporação Sigma-Aldrich e as suas companhias afiliadas, não responderão por nenhum dano resultante do manuseio ou do contato com o produto acima. Consultar www.sigma-aldrich.com e/ou o verso da factura ou nota que acompanha o produto para tomar conhecimento dos termos adicionais e condições de venda.

Anexo III. Determinação da CQO

A determinação da CQO foi elaborada através do método de refluxo aberto, descrito no *Standart Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA, 2005). O processo foi realizado durante a fração solúvel das amostras.

1. Reagentes:

- **Ácido sulfúrico**, $c(\text{H}_2\text{SO}_4) = 4 \text{ mol.L}^{-1}$;
- **Ácido sulfúrico - Sulfato de prata**;
- **Dicromato de potássio**, solução padrão de referência, $c(\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7) = 0,040 \text{ mol.L}^{-1}$, contendo um sal de mercúrio (II);
- **Sulfato de ferro(II) e amônio**, solução titulada, $c[\text{Fe}(\text{SO}_4)_2(\text{NH}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}] \approx 0,12 \text{ mol.L}^{-1}$. Esta solução deve ser padronizada do seguinte modo:
 - Diluir 10 mL da solução padrão de referência de dicromato de potássio com cerca de 100 mL de ácido sulfúrico. Titular com a solução de sulfato de ferro (II) e amônio, na presença de 2 ou 3 gotas de indicador ferroína.
 - A concentração, c , expressa em moles por litro, da solução de sulfato de ferro (II) e amônio é dada pela fórmula:

$$c = \frac{10,0 \times 0,04 \times 6}{V} = \frac{2,4}{V}$$

Onde:

V = volume, em mililitros, da solução de sulfato de ferro (II) e amônio consumido na titulação.

- **Hidrogenoftalato de potássio**, solução padrão de referência, $c(\text{KC}_8\text{H}_5\text{O}_4) = 2,0824 \text{ mol.L}^{-1}$;
- **Ferroína**, solução indicadora.

2. Equipamento

- **Aparelho de refluxo**: constituído por um erlenmeyer ou um tubo com gargalo esmerilado ligado a um refrigerante de modo a evitar qualquer perda importante de matéria volátil.
- **Manta**, placa ou outro qualquer equipamento para aquecimento que permita levar a amostra à ebulição em menos de 10 minutos.
- **Bureta de precisão**, com 10 mL de capacidade, graduada em 0,02 mL.
- **Reguladores de ebulição**. Esferas de vidro rugosas, de 2 a 3 mm de diâmetro, ou outros reguladores de ebulição.
- **Material corrente de laboratório**.

3. Modo Operatório

- Medir 10 mL de amostra (diluída se necessário) para um balão ou tubo do aparelho de refluxo e juntar 5 mL da solução de dicromato de potássio e alguns reguladores de ebulição. Agitar cuidadosamente.
- Juntar lentamente e com precaução 15 mL da mistura ácido sulfúrico-sulfato de prata e ligar imediatamente o balão ou tubo ao refrigerante.
- Levar a mistura reacional à ebulição em 10 minutos e continue a ebulição durante mais 110 minutos. A temperatura da mistura reacional deve ser de 148°C.
- Arrefecer o balão ou tubo imediatamente em água fria até cerca de 60°C, lavando simultaneamente o refrigerante com uma pequena quantidade de água destilada. Retirar o refrigerante e diluir a mistura reacional a cerca de 75 mL. Arrefecer até à temperatura ambiente.
- Titular o excesso de dicromato com a solução de sulfato de ferro (II) e amónio, na presença de 1 ou 2 gotas da solução indicadora de ferroína.

- Ensaio em branco

Efetuar em paralelo dois ensaios em branco com cada série de determinações admitindo o mesmo modo operatório anteriormente descrito, mas substituindo a toma de amostra por 10 mL de água destilada.

4. Resultados

A carência química de oxigénio, CQO, expressa em miligramas por litro, é dada pela fórmula seguinte:

$$\text{CQO (mg O}_2\text{/L)} = \frac{8000 \times c \times (V_1 - V_2)}{V_0}$$

Onde:

c = concentração, em moles por litro, da solução de sulfato de ferro (II) e amónio;

V_0 = volume, em mililitros, da toma para ensaio antes da diluição;

V_1 = volume, em mililitros, da solução de sulfato de ferro (II) e amónio consumido no ensaio em branco;

V_2 = volume, em mililitros, da solução de sulfato de ferro (II) e amónio consumido no ensaio com a amostra;

8000 = massa molar, em miligramas por litro, de 1/2 de O_2 .

Anexo IV. Determinação dos SST, SSV e SSNV

O processo realizado para a determinação dos SST, SSV e SSNV foi elaborado com recurso ao *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA, 2005).

Sólidos em suspensão totais (SST)

- Preparar e pesar uma cápsula de porcelana com uma membrana de microfibras de vidro (1,2 µm) do tipo Whatman GF/C (águas residuais) (**A'**, g)
- Colocar a membrana filtrante no porta-filtros para filtração em vácuo
- Medir, com pipeta, um volume **V** de amostra (neste caso, foram 50 mL de amostra) e filtrá-la em vácuo moderado para evitar danificar o filtro. Deixar secar o filtro, retirá-lo e coloca-lo na cápsula.
- Colocar a cápsula em estufa a 103°C-105°C durante 1 a 2 horas
- Retirar a cápsula para exsiccador e esperar que arrefeça
- Pesar a cápsula + SST em balança analítica (**B'1**)
- Voltar a colocar a cápsula na estufa durante 1 a 2 horas
- Retirar para exsiccador e esperar que arrefeça
- Pesar a cápsula + SST em balança analítica (**B'2**)
- Se **B'1** – **B'2** < 0,5mg, considerar **B'2** o peso final (**B'**) (g). Caso contrário voltar a colocar a cápsula na estufa mais 1 a 2 horas e repetir o procedimento de arrefecimento e pesagem até obter um peso que não difira do anterior mais de 0,5mg.
- Calcular SST:

$$\text{SST (mg/L)} = \frac{(B' - A')}{V_{\text{amostra}}} \times 10^6$$

Sólidos em suspensão voláteis (SSV) e não voláteis (SSNV)

- Colocar a cápsula, com a membrana filtrante e SST secos, na mufla a 550°C durante 1 hora
- Retirar para exsiccador e esperar que arrefeça
- Pesar a cápsula + SSNV em balança analítica (**C'**) (g)
- Calcular SSV e SSNV:

$$\text{SSV (mg/L)} = \frac{(B' - C')}{V_{\text{amostra}}} \times 10^6$$

$$\text{SSNV (mg/L)} = \frac{(C' - A')}{V_{\text{amostra}}} \times 10^6$$

Anexo V. Cromatogramas da Curva de Calibração e valores associados

Para a elaboração da curva de calibração referenciada no ponto 4.2.4, foi necessário analisar os cromatogramas de cada padrão preparado. A **Figura V.1** apresenta um cromatograma exemplo da detecção de E2 e EE2 no comprimento de onda de 281 nm e na **Figura V.2** pode-se visualizar os tempos de retenção referentes a cada fármaco.

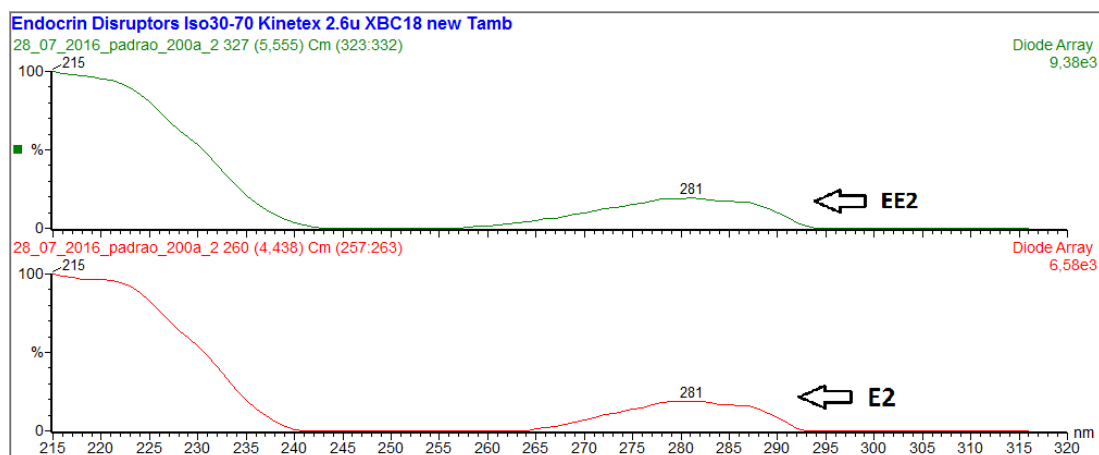


Figura V.1. Espectros de absorção dos fármacos E2 e EE2 na gama 215 – 320 nm.

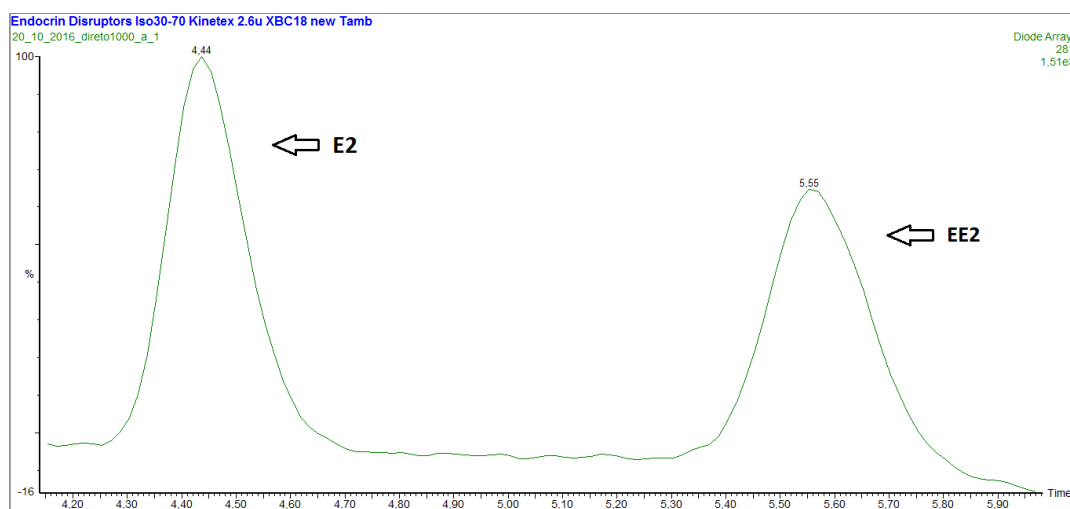


Figura V.2. Cromatograma com os tempos de retenção dos fármacos E2 (tr=4,44 min) e EE2 (tr=5,55min).

Na **Figura V.3** observam-se alguns dos cromatogramas dos padrões utilizados na elaboração das curvas de calibração utilizadas nos dois ensaios. Em seguida, na **Tabela V.1** apresentam-se os valores dos TRC e da média das áreas dos picos de cada composto, essenciais para determinar as curvas de calibração e as suas respetivas equações.

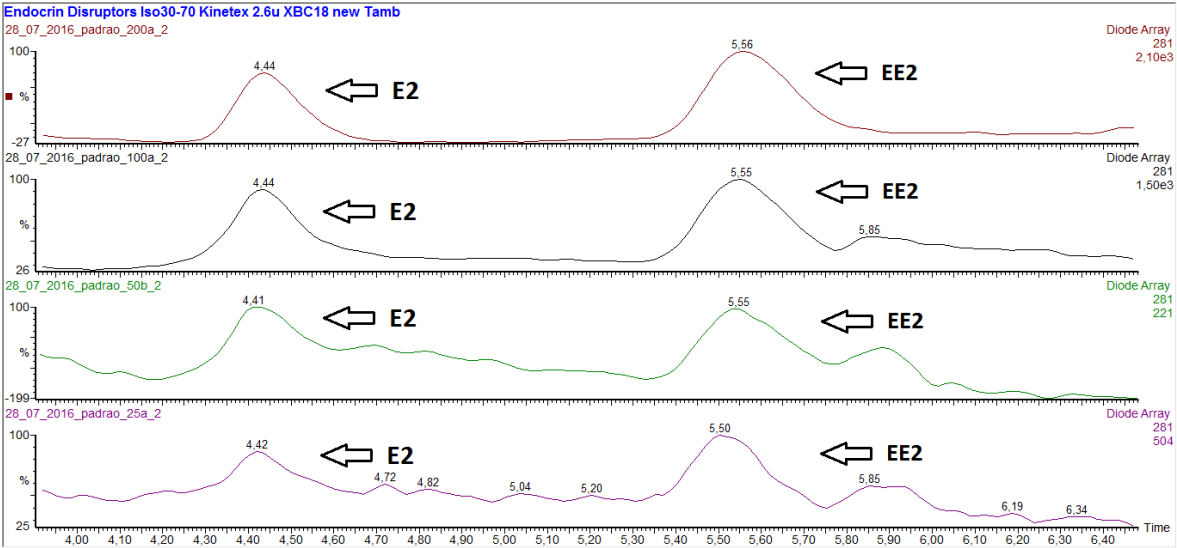


Figura V.3. Cromatogramas de alguns padrões utilizados na elaboração das curvas de calibração, com concentrações de 25, 50, 100 e 200 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de E2 e EE2 ($\lambda = 281 \text{ nm}$).

Tabela V.1. Valores correspondentes aos TRC, às áreas e à média das áreas utilizados para a elaboração das curvas de calibração de E2 e EE2.

E2				EE2			
Concentração ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	TRC (min)	Área	Média	Concentração ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	TRC (min)	Área	Média
25	4,4	28	35,0	25	5,5	51	45,0
	4,4	42			5,6	39	
	4,5	4			5,6	18	
50	-	-	62,5	50	-	-	82,5
	4,4	70			5,6	94	
	4,5	55			5,6	71	
100	4,4	175	167,0	100	5,6	199	221,5
	4,5	94			5,6	130	
	4,4	159			5,5	244	
200	4,4	370	370,5	200	5,6	598	584,0
	4,5	193			5,6	281	
	4,4	371			5,6	570	

Anexo VI. Cromatogramas dos brancos em água desmineralizada e determinação do LD e LQ

Para calcular estes limites foi necessário analisar brancos preparados em água desmineralizada, os cromatogramas correspondentes a estes brancos encontram-se na **Figura VI.1**. Apesar de aparecerem alguns picos nos tempos de retenção do E2 e EE2, estes não foram detetados nos brancos. Os cálculos necessários para a determinação do LD e LQ podem ser consultados na **Tabela VI.1**.

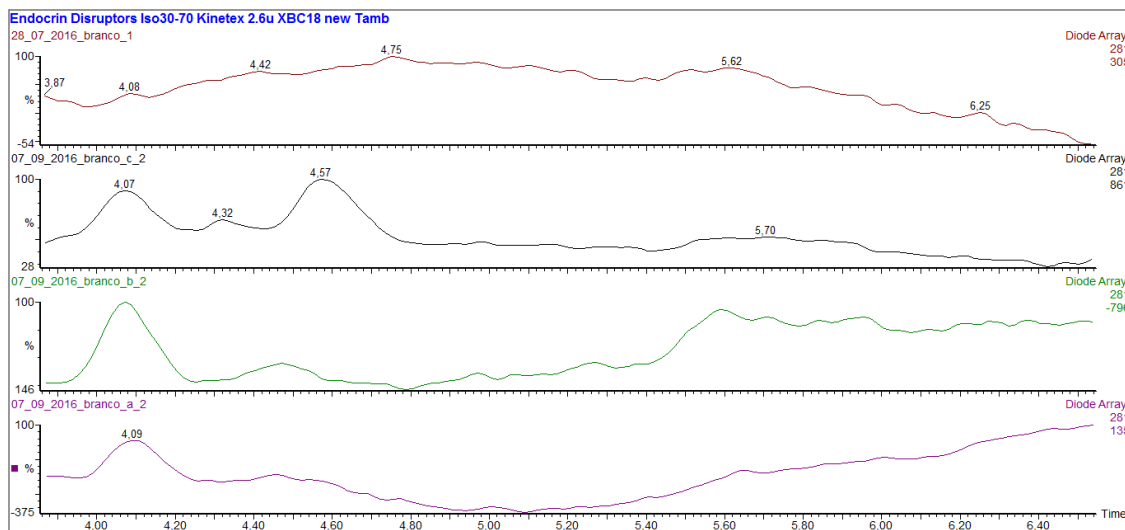


Figura VI.1. Cromatogramas referentes aos brancos preparados em água desmineralizada.

Tabela VI.1. Valores dos TRC, áreas do pico e respetivas concentrações de E2 e EE2 correspondentes aos brancos de água desmineralizada, necessários para calcular o LD e LQ.

E2			EE2		
TRC (min)	Área	Concentração ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	TRC (min)	Área	Concentração ($\mu\text{g.L}^{-1}$)
4,4	3	14,64	5,5	2	20,42
4,5	3	14,31	5,7	3	20,67
4,5	10	18,03	5,6	4	21,07
4,6	57	41,76	5,7	5	21,35
	Média	14,64		Média	20,87
	DV	2,06		DV	0,42

Anexo VII. Determinação da concentração de CQO associada ao metanol presente nos padrões de E2 e EE2

Os valores de CQO t utilizados para determinar a concentração de CQO associada ao metanol presente nos padrões dos compostos em estudo, podem ser consultados na **Tabela VII.1**. Na **Tabela VII.2** e **Tabela VII.3** encontram-se os valores utilizados na determinação da concentração de CQO associada ao metanol presente na alimentação do reator no primeiro e segundo ensaio, respetivamente.

Tabela VII.1. Valores de CQO t utilizados para determinar a concentração de CQO associada ao metanol presente nos padrões de E2 e EE2.

Composto	Fórmula Empírica	X (Carbono)	Y (Hidrogénio)	Z (Oxigénio)	CQO (mg CQO/mg C _x H _y O _z)
Metanol	CH ₄ O	1	4	1	1,5
E2	C ₁₈ H ₂₄ O ₂	18	24	2	2,71
EE2	C ₂₀ H ₂₄ O ₂	20	24	2	2,70

Tabela VII.2. Cálculos para determinar a contribuição em termos de CQO, do metanol usado para preparar a solução mãe do fármaco utilizado no primeiro ensaio.

Solução-mãe de fármaco	Unidade	Densidade (Kg.L ⁻¹)	gr de produto	Conversão CQO (gr CQO.gr ⁻¹)	gr CQO	Concentração do balão (mg.L ⁻¹ CQO)	Caudal diário (L.dia ⁻¹)	Balão fármaco (adicionado.dia ⁻¹) L	CQO
Balão	10	mL							
Metanol	10	mL	0,8	1,5	12				
E2			0,014	2,7	0,03788				
Total					12,03788	1203788			
Jerrican							14	0,001	1204
Concentração de fármaco	1400	mg.L ⁻¹							86,0

Tabela VII.3. Cálculos para determinar a contribuição em termos de CQO, do metanol usado para preparar a solução mãe dos fármacos utilizados no segundo ensaio.

Solução-mãe de fármaco	Unidade	Densidade (Kg.L ⁻¹)	gr de produto	Conversão CQO (gr CQO.gr ⁻¹)	gr CQO	Concentração do balão (mg.L ⁻¹ CQO)	Caudal diário (L.dia ⁻¹)	Balão fármaco (adicionado.dia ⁻¹) L	CQO
Balão	10	mL							
Metanol	10	mL	0,8	1,5	12				
E2			0,014	2,7	0,03788				
EE2			0,014	2,7	0,03784				
Total					12,07572	1207572			
Jerrican							14	0,001	1208
Concentração de fármaco	1400	mg.L ⁻¹							86,3

Anexo VIII. Parâmetros de Controlo referentes ao Ensaio 1

Na **Tabela VIII.1** apresentam-se os valores de CQO à entrada e saída do reator no decorrer do primeiro ensaio, durante a injeção do fármaco. Os valores correspondentes aos SST, SSNV e SSV encontram-se na **Tabela VIII.2**.

Tabela VIII.1. Controlo diário de CQO à entrada e saída do reator, durante o primeiro ensaio.

CQO			
Data	Dia	Concentração à entrada (mg O ₂ .L ⁻¹)	Concentração à saída (mg O ₂ .L ⁻¹)
27/06/2016	0	134,4	96,8
28/06/2016	1	134,4	63,0
29/06/2016	2	105,6	52,8
30/06/2016	3	132,0	44,0
01/07/2016	4	124,8	76,8
02/07/2016	5	126,2	72,0
03/07/2016	6	140,8	74,8
04/07/2016	7	113,0	63,3
05/07/2016	8	127,4	70,4

Tabela VIII.2. Controlo diário de SST, SSNV e SSV à saída do reator, ao longo do primeiro ensaio.

Data	Dia	SST	SSNV	SSV
		(mg.L ⁻¹)		
27/06/2016	0	22	4	18
28/06/2016	1	40	0	40
29/06/2016	2	42	2	40
30/06/2016	3	40	0	40
01/07/2016	4	46	6	40
02/07/2016	5	43	3	41
03/07/2016	6	45	6	40
04/07/2016	7	58	2	56
05/07/2016	8	60	0	60

O comportamento dos sólidos existentes dentro do reator está evidenciado na **Figura VIII.1**, só são apresentados os valores de SST pelo facto da maior parte dos sólidos serem SSV, por isso, não há necessidade de apresentar os SSNV.

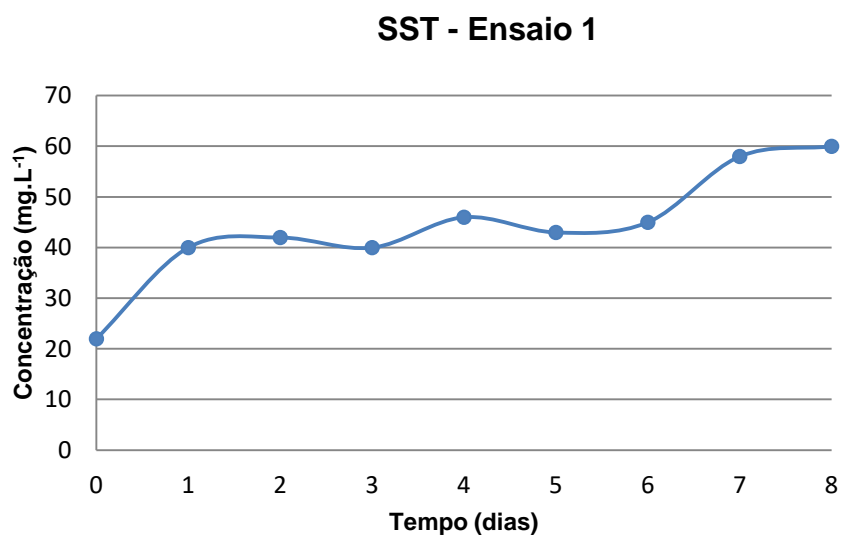


Figura VIII.1. Evolução da concentração dos SST ao longo do Ensaio 1.

Anexo IX. Cromatogramas correspondentes ao Ensaio 1

Na **Figura IX.1** visualizam-se os cromatogramas da AR bruta e da AR com uma injeção de $100 \mu\text{g.L}^{-1}$ de E2 para verificar se existia alguma quantidade do composto em estudo na AR utilizada no primeiro ensaio. Comparando os dois cromatogramas, é possível observar que a área do pico da AR com E2 é muito mais elevada e que apesar de aparecer um pequeno pico na AR bruta no tempo de retenção do composto (4,4 min), comprovou-se que não corresponde ao E2 ao analisar o espectro no comprimento de onda de 281 nm.

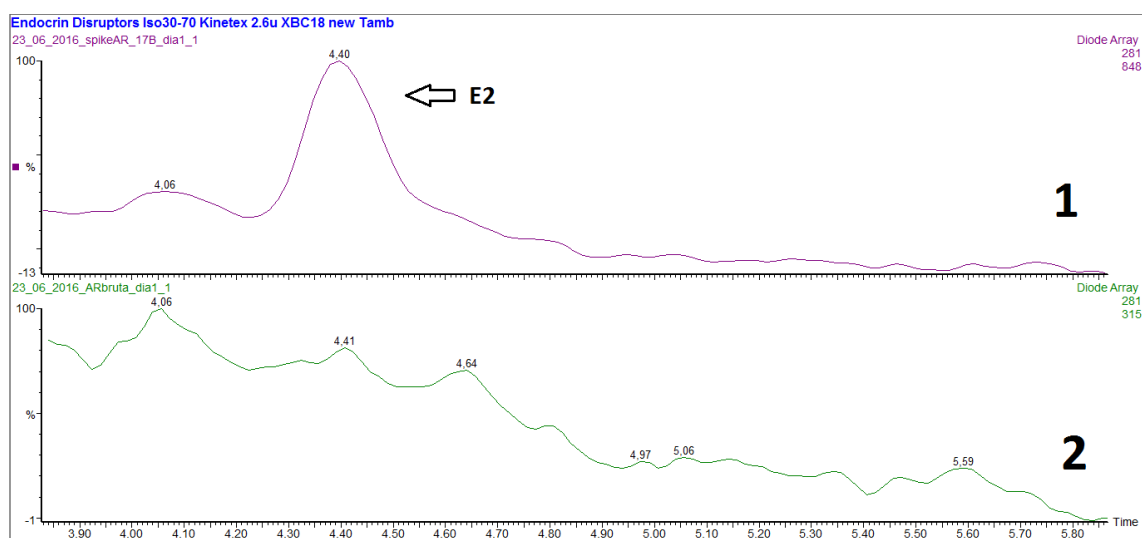


Figura IX.1. Cromatogramas alusivos à AR utilizada ao longo do primeiro ensaio. (1- Cromatograma da AR com E2; 2- Cromatograma da AR bruta)

Na **Figura IX.2** e **Figura IX.3** observam-se os cromatogramas obtidos ao longo do primeiro ensaio, relativos aos nove dias de injeção de E2 na alimentação do reator. O dia 0 corresponde ao início da injeção de E2 e por isso é referente ao efluente de entrada, os restantes dias são referentes ao efluente de saída do reator. Os valores das áreas dos picos, retirados destes cromatogramas, utilizados para calcular a concentração de E2 estão presentes na **Tabela IX.1**.

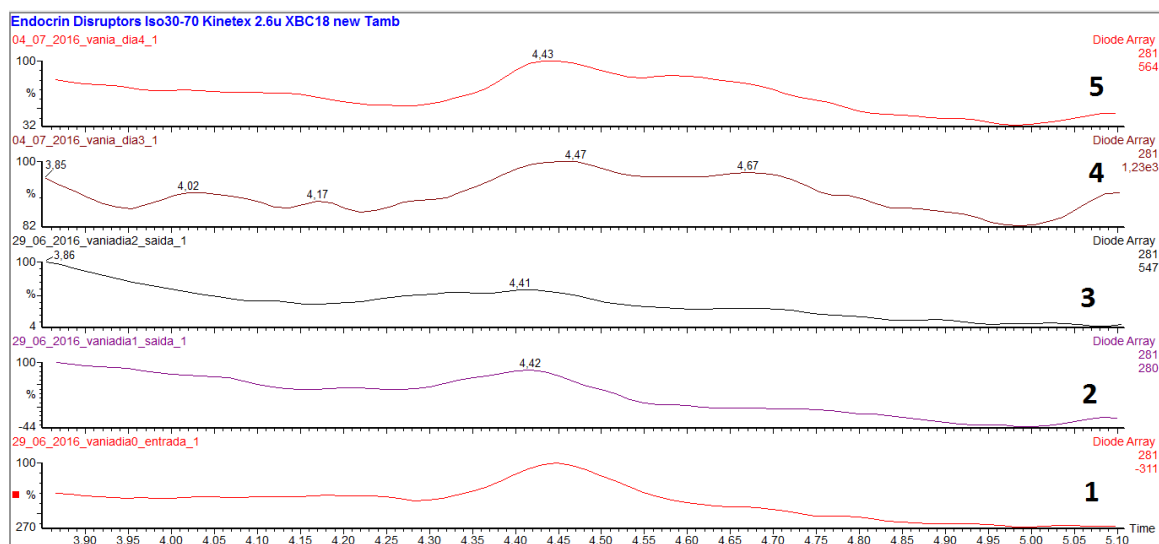


Figura IX.2. Cromatogramas referentes aos dias 0, 1, 2, 3 e 4 do primeiro ensaio, com uma concentração de $100 \mu\text{g.L}^{-1}$ de E2. (1- Dia 0; 2- Dia 1; 3- Dia 2; 4- Dia 3; 5- Dia 4) ($\lambda = 281 \text{ nm}$).

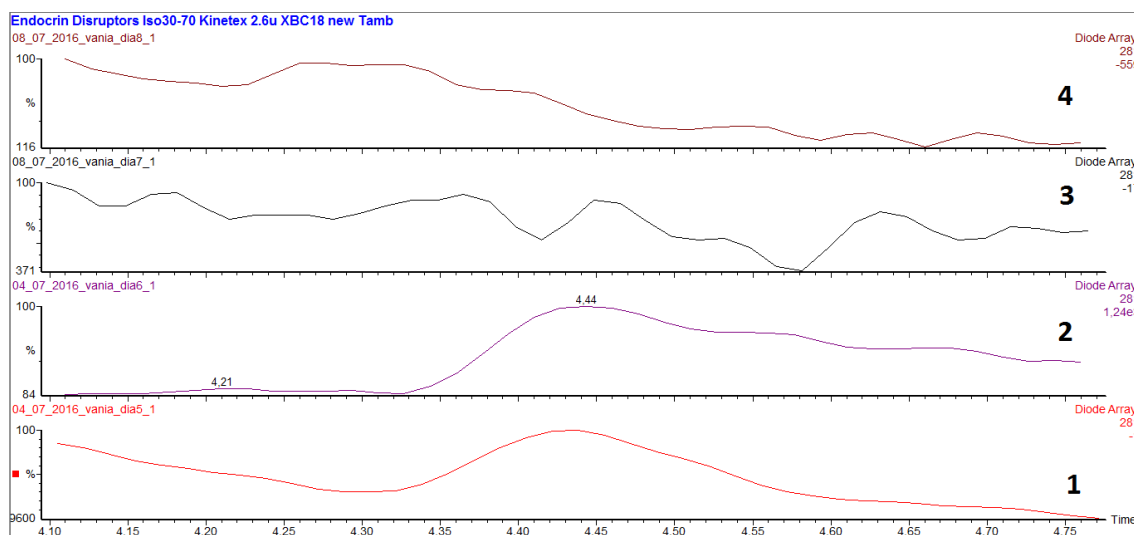


Figura IX.3. Cromatogramas referentes aos dias 5, 6, 7 e 8 do primeiro ensaio, com uma concentração de $100 \mu\text{g.L}^{-1}$ de E2. (1- Dia 5; 2- Dia 6; 3- Dia 7; 4- Dia 8) ($\lambda = 281 \text{ nm}$).

Tabela IX.1. Valores correspondentes aos tempos de retenção, áreas do pico e concentrações de E2, no decorrer do primeiro ensaio.

Data	Dia	E2		
		TRC (min)	Área	Concentração ($\mu\text{g.L}^{-1}$)
27/06/2016	0	4,5	46	36,28
28/06/2016	1	4,4	25	25,61
29/06/2016	2	4,4	5	15,42
30/06/2016	3	4,5	10	17,96
01/07/2016	4	4,4	20	23,06
02/07/2016	5	4,4	32	29,17
03/07/2016	6	4,4	13	19,49
04/07/2016	7	4,4	24	25,10
05/07/2016	8	4,4	30	28,15

Na **Tabela IX.2** apresentam-se os valores da eficiência de remoção do E2 no decorrer do primeiro ensaio.

Tabela IX.2. Eficiência de remoção de E2, ao longo do primeiro ensaio.

Data	Dia	Eficiência de Remoção (%)
		E2
27/06/2016	0	-
28/06/2016	1	74,4
29/06/2016	2	84,6
30/06/2016	3	82,0
01/07/2016	4	76,9
02/07/2016	5	70,8
03/07/2016	6	80,5
04/07/2016	7	74,9
05/07/2016	8	71,8
Média		75,9

Anexo X. Parâmetros de Controlo referentes ao Ensaio 2

Na **Tabela X.1** apresentam-se os valores de CQO à entrada e saída do reator no decorrer do segundo ensaio, durante a injeção do fármaco. Os valores correspondentes aos SST, SSNV e SSV encontram-se na **Tabela X.2**.

Tabela X.1. Controlo diário de CQO à entrada e saída do reator, durante o Ensaio 2.

CQO			
Data	Dia	Concentração à entrada (mg O ₂ .L ⁻¹)	Concentração à saída (mg O ₂ .L ⁻¹)
19/07/2016	0	158,0	80,6
20/07/2016	1	132,0	70,4
21/07/2016	2	130,2	70,4
22/07/2016	3	144,5	86,4
23/07/2016	4	129,2	73,6
24/07/2016	5	131,6	76,8
25/07/2016	6	132,0	76,8
26/07/2016	7	128,0	79,2
27/07/2016	8	130,8	79,2

Tabela X.2. Controlo diário de SST, SSNV e SSV à saída do reator, ao longo do Ensaio 2.

Data	Dia	SST	SSNV	SSV
		(mg.L ⁻¹)		
19/07/2016	0	58	2	56
20/07/2016	1	116	4	112
21/07/2016	2	140	8	132
22/07/2016	3	44	6	38
23/07/2016	4	150	4	146
24/07/2016	5	140	8	132
25/07/2016	6	104	6	98
26/07/2016	7	194	14	180
27/07/2016	8	148	12	136

O comportamento dos sólidos existentes dentro do reator está evidenciado na **Figura X.1**, só são apresentados os valores de SST pelo facto da maior parte dos sólidos serem SSV, por isso, não há necessidade de apresentar os SSNV.

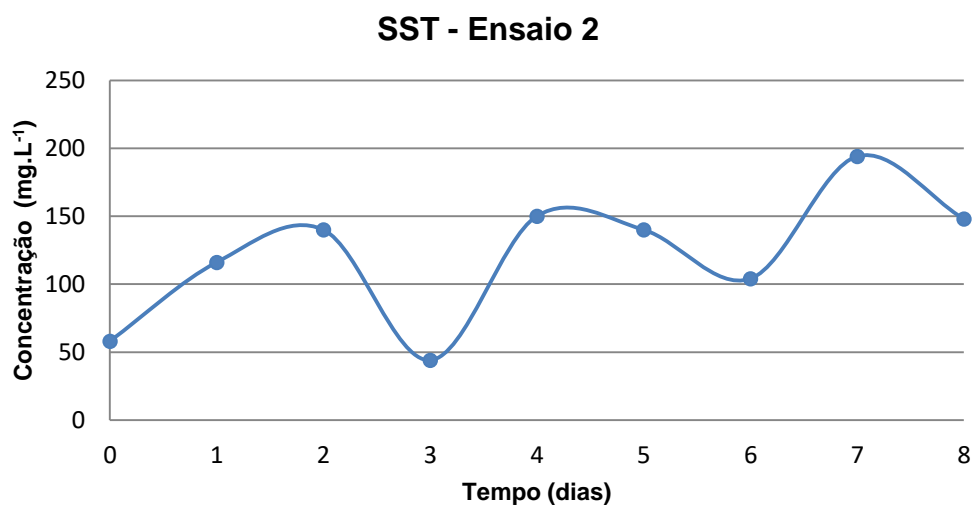


Figura X.1. Evolução da concentração dos SST ao longo do Ensaio 2.

Anexo XI. Cromatogramas correspondentes ao Ensaio 2

Na **Figura XI.1** visualizam-se os cromatogramas da AR bruta e da AR com uma injeção de $100 \mu\text{g.L}^{-1}$ dos dois fármacos para verificar se existia alguma quantidade de E2 ou EE2 na AR utilizada durante o segundo ensaio. Comparando os dois cromatogramas, é possível observar com exatidão que no cromatograma da AR bruta não existe qualquer tipo de pico no tempo de retenção dos compostos e ao analisar o espectro no comprimento de onda de 281 nm confirmou-se que E2 e EE2 não estavam presentes na AR.

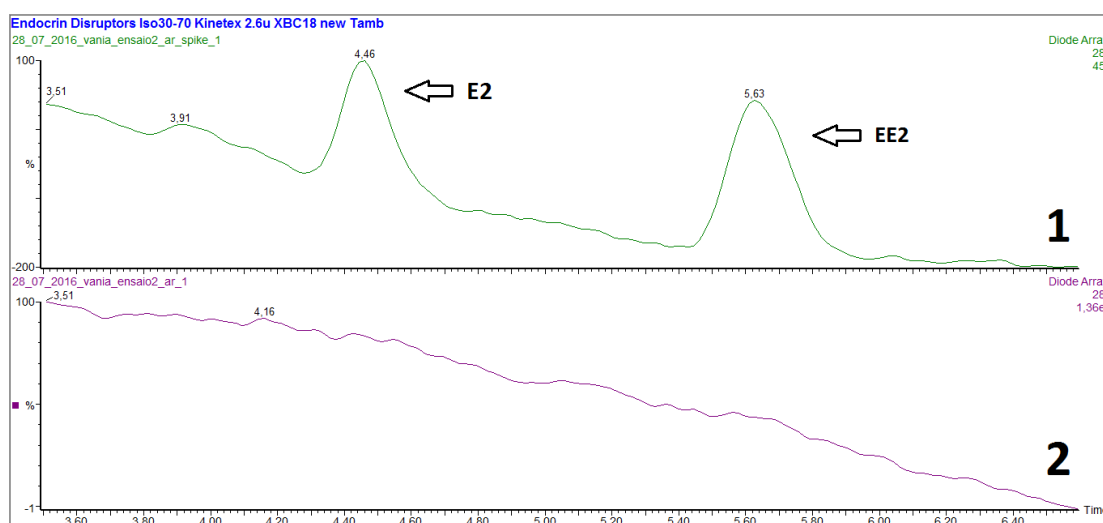


Figura XI.1. Cromatogramas alusivos à AR utilizando ao longo do segundo ensaio. 1- Cromatograma da AR com E2 e EE2; 2- Cromatograma da AR bruta ($\lambda = 281 \text{ nm}$).

Na **Figura XI.2** e **Figura XI.3** observam-se os cromatogramas obtidos ao longo do segundo ensaio, relativos aos nove dias de injeção de E2 e EE2 na alimentação do reator. O dia 0 corresponde ao início da injeção dos fármacos e por isso é referente ao efluente de entrada, os restantes dias são referentes ao efluente de saída do reator. Os valores das áreas dos picos, retirados destes cromatogramas, utilizados para calcular a concentração de E2 e EE2 estão presentes na **Tabela XI.1**.

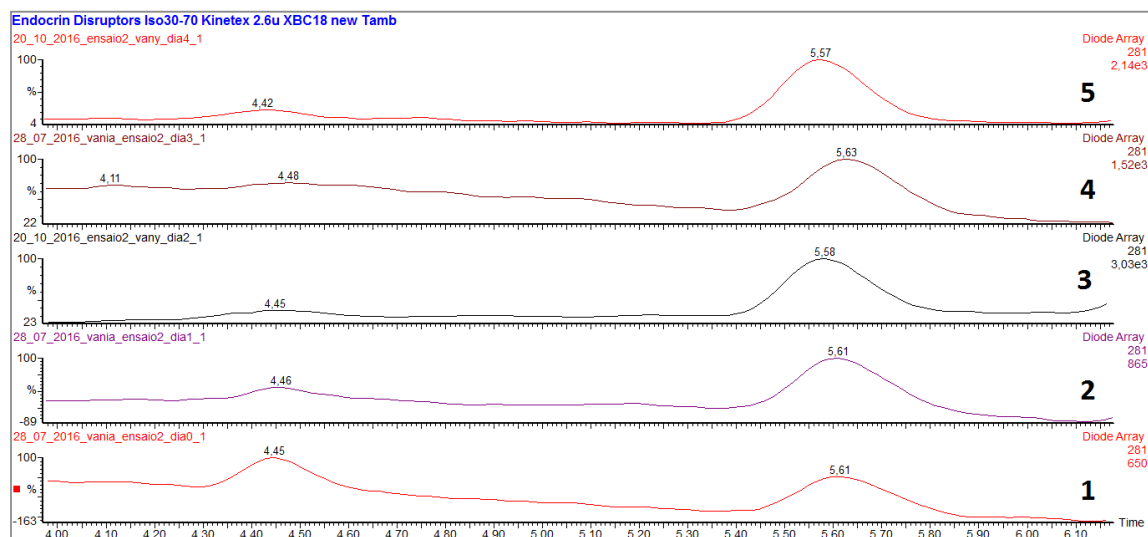


Figura XI.2. Cromatogramas referentes aos dias 0, 1, 2, 3 e 4 do segundo ensaio, com uma concentração de $100 \mu\text{g.L}^{-1}$ de E2 e EE2. (1- Dia 0; 2- Dia 1; 3- Dia 2; 4- Dia 3; 5- Dia 4) ($\lambda = 281 \text{ nm}$).

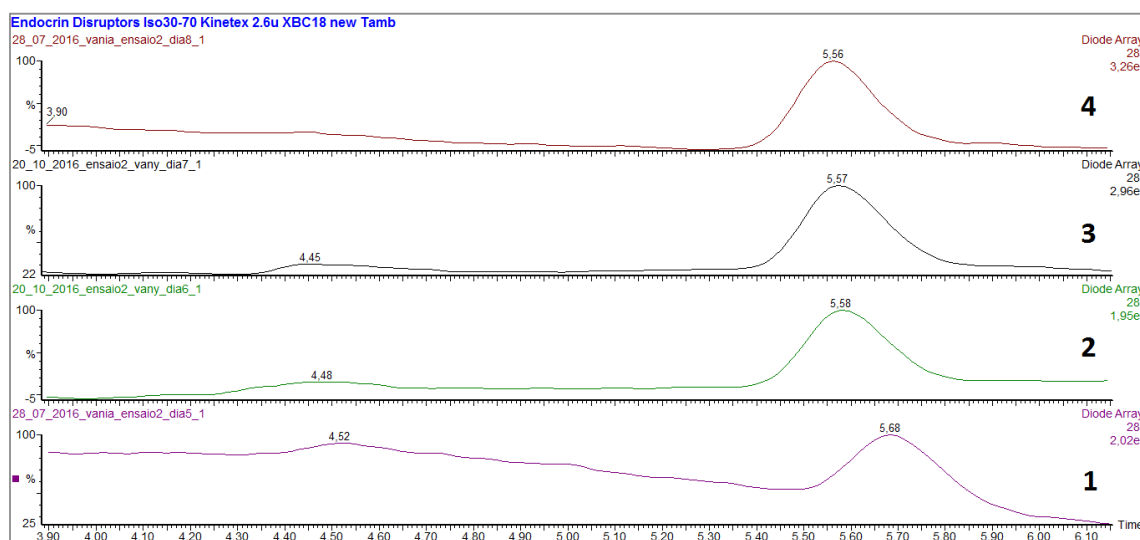


Figura XI.3. Cromatogramas referentes aos dias 5, 6, 7 e 8 do segundo ensaio, com uma concentração de $100 \mu\text{g.L}^{-1}$ de E2 e EE2. (1- Dia 5; 2- Dia 6; 3- Dia 7; 4- Dia 8) ($\lambda = 281 \text{ nm}$).

Tabela XI.1. Valores correspondentes ao tempo de retenção, área do pico e concentração de E2 e EE2, no decorrer do segundo ensaio.

Data	Dia	E2			EE2		
		TRC (min)	Área	Concentração ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	TRC (min)	Área	Concentração ($\mu\text{g.L}^{-1}$)
19/07/2016	0	4,5	129	78,59	5,6	226	91,45
20/07/2016	1	4,5	63	44,97	5,6	302	115,53
21/07/2016	2	4,5	67	47,13	5,6	418	152,28
22/07/2016	3	4,5	4	14,91	5,6	224	90,82
23/07/2016	4	4,4	56	41,21	5,6	420	152,90
24/07/2016	5	4,5	28	27,14	5,7	251	99,37
25/07/2016	6	4,5	56	41,40	5,6	346	129,48
26/07/2016	7	4,5	60	43,58	5,6	449	161,98
27/07/2016	8	4,5	2	14,04	5,6	643	223,53

Na **Tabela XI.2** apresentam-se os valores da eficiência de remoção do E2 e EE2 no decorrer do segundo ensaio.

Tabela XI.2. Eficiência de remoção de E2 e EE2, ao longo do segundo ensaio.

Data	Dia	Eficiência de Remoção (%)	
		E2	EE2
19/07/2016	0	-	-
20/07/2016	1	55,0	-15,5
21/07/2016	2	52,9	-52,3
22/07/2016	3	85,1	9,2
23/07/2016	4	58,8	-52,9
24/07/2016	5	72,9	0,6
25/07/2016	6	58,6	-29,5
26/07/2016	7	56,4	-62,0
27/07/2016	8	86,0	-123,5
Média		58,7	-40,9

Anexo XII. Cromatogramas da Curva de Calibração em Metanol

Para a elaboração da curva de calibração em metanol referenciada no ponto 4.2.8, foi necessário analisar os cromatogramas de cada padrão preparado em metanol. Na **Figura XII.1** observam-se alguns dos cromatogramas dos padrões utilizados na elaboração das curvas de calibração em metanol. Em seguida, na **Tabela XII.1** apresentam-se os valores dos TRC e da média das áreas dos picos de cada composto, essenciais para determinar as curvas de calibração em metanol e as suas respectivas equações.

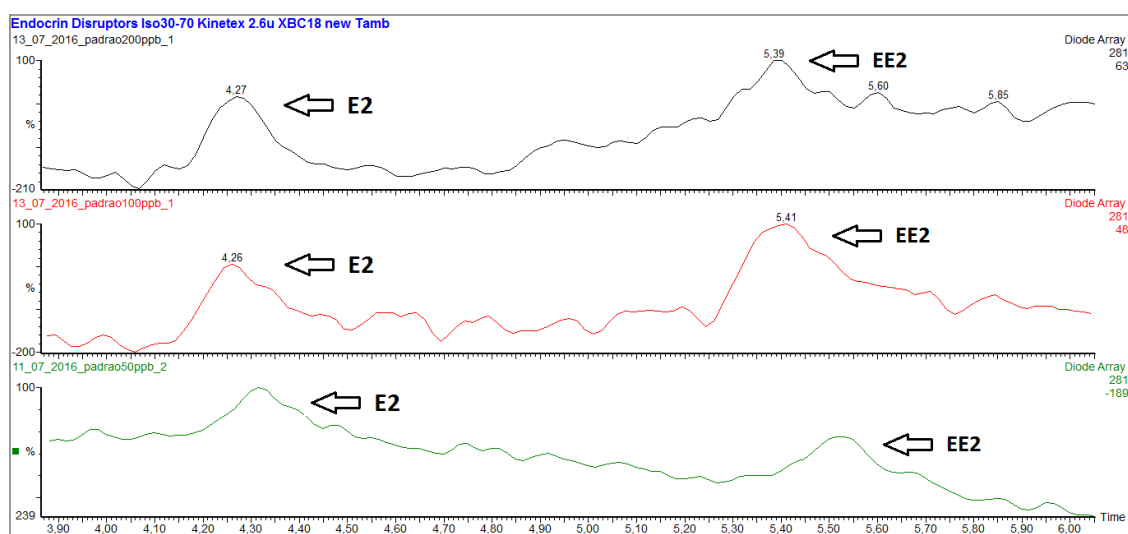


Figura XII.1. Cromatogramas de alguns padrões utilizados na elaboração das curvas de calibração em metanol, com concentrações de 50, 100 e 200 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de E2 e EE2 ($\lambda = 281 \text{ nm}$).

Tabela XII.1. Valores correspondentes aos TRC, às áreas e à média das áreas utilizados para a elaboração das curvas de calibração em metanol de E2 e EE2.

E2				EE2			
Concentração ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	TRC (min)	Área	Média	Concentração ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	TRC (min)	Área	Média
50	4,3	14,85	14,42	50	5,5	15,55	12,64
	4,3	11,72			5,5	10,31	
	4,3	16,68			5,4	12,05	
100	4,3	17,57	14,08	100	5,5	9,97	12,36
	4,3	8,31			5,5	6,48	
	4,3	10,59			5,4	14,74	
200	4,4	21,73	18,11	200	5,5	18,16	18,16
	4,4	4,25			5,5	3,90	
	4,3	14,49			5,5	7,29	

Anexo XIII. Cromatogramas da Curva de Calibração Direta

Para a elaboração da curva de calibração elaborada com padrões diretos, referenciada no ponto 4.2.8, foi necessário analisar os cromatogramas de cada padrão injetado diretamente no HPLC-DAD. Na **Figura XIII.1** observam-se alguns dos cromatogramas dos padrões utilizados na elaboração destas curvas de calibração. Em seguida, na **Tabela XIII.1** apresentam-se os valores dos TRC e da média das áreas dos picos de cada composto, essenciais para determinar as curvas de calibração de padrões diretos e as suas respectivas equações.

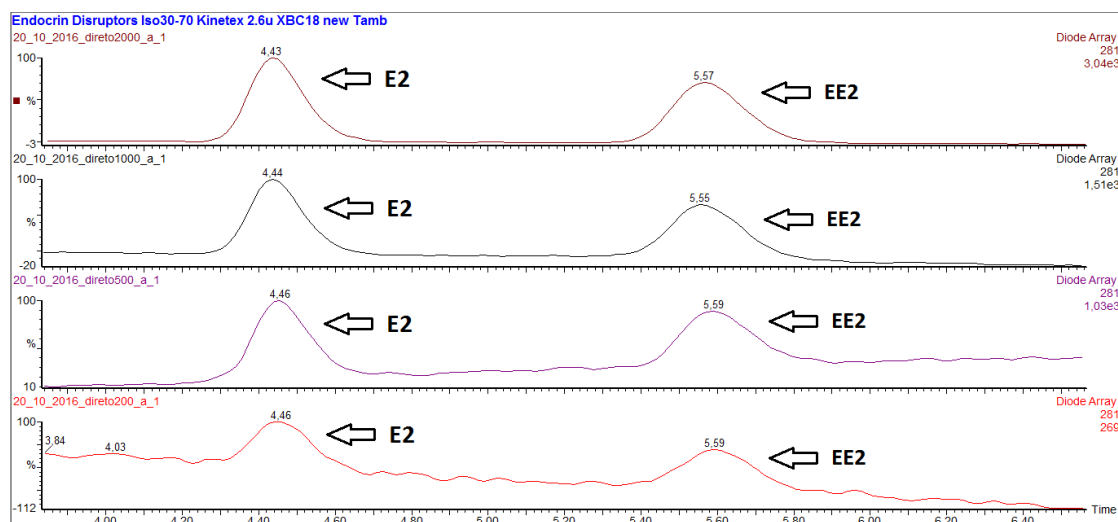


Figura XIII.1. Cromatogramas de alguns padrões utilizados na elaboração das curvas de calibração diretas com concentrações de 200, 500, 1000 e 2000 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de E2 e EE2 ($\lambda = 281 \text{ nm}$).

Tabela XIII.1. Valores correspondentes aos TRC, às áreas e à média das áreas utilizados para a elaboração das curvas de calibração diretas de E2 e EE2.

E2				EE2			
Concentração ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	TRC (min)	Área	Média	Concentração ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	TRC (min)	Área	Média
200	4,46	52,36	51,9	200	5,59	55,33	48,1
	4,43	51,35			5,57	40,88	
500	4,46	146,94	134,5	500	5,59	116,37	117,5
	4,45	122,03			5,58	118,63	
1000	4,44	267,28	283,5	1000	5,55	251,13	266,7
	4,44	299,78			5,58	282,19	
2000	4,43	522,33	566,4	2000	5,57	481,59	522,7
	4,44	610,37			5,56	563,83	

Anexo XIV. Cromatogramas da Fotodegradação de E2 e EE2

Na **Figura XIV.1** observam-se alguns dos cromatogramas do teste de fotodegradação, realizado durante 5 dias e com padrões com uma concentrações inicial de $500 \mu\text{g.L}^{-1}$. Em seguida, na **Tabela XIV.1** e **Tabela XIV.2** apresentam-se os valores dos TRC, das áreas dos picos e da respetiva concentração, de cada composto.

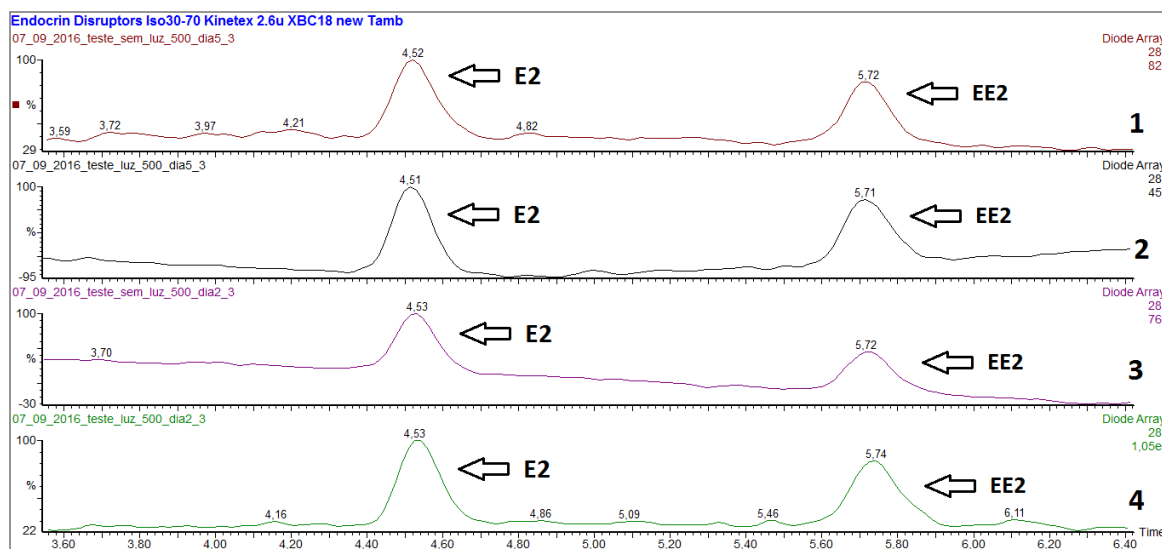


Figura XIV.1. Cromatogramas de algumas amostras diretas referentes ao teste de fotodegradação de E2 e EE2. (1- Dia 5, sem luz; 2- Dia 5, com luz; 3- Dia 2, sem luz; 4- Dia 2, com luz) ($\lambda = 281 \text{ nm}$).

Tabela XIV.1. Valores correspondentes aos tempos de retenção, áreas dos picos e concentrações de E2 e EE2, quando expostos à luz solar ao longo de 5 dias.

Luz	E2			EE2		
	TRC (min)	Área	Concentração ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	TRC (min)	Área	Concentração ($\mu\text{g.L}^{-1}$)
Dia 0	4,54	60	230,58	5,75	58	245,97
Dia 1	4,52	67	254,99	5,72	70	291,05
Dia 2	4,53	85	317,78	5,74	84	343,64
Dia 3	-	-	-	-	-	-
Dia 4	4,52	25	108,50	5,7	31	144,54
Dia 5	4,51	86	321,27	5,71	86	351,15

Tabela XIV.2. Valores correspondentes aos tempos de retenção, áreas dos picos e concentrações de E2 e EE2, quando desprovidos de luz solar ao longo de 5 dias.

S/ Luz	E2			EE2		
	TRC (min)	Área	Concentração ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	TRC (min)	Área	Concentração ($\mu\text{g.L}^{-1}$)
Dia 0	4,54	91	338,70	5,73	73	302,32
Dia 1	4,54	126	460,78	5,74	82	336,13
Dia 2	4,53	72	272,43	5,72	50	215,92
Dia 3	4,51	102	377,07	5,71	80	328,61
Dia 4	4,52	65	248,02	5,71	53	227,19
Dia 5	4,52	63	241,04	5,72	44	193,38

Anexo XV. Cromatogramas da adsorção de E2 e EE2 ao *acrodisc*

Na **Figura XV.2** e **Figura XV.1**, observam-se os cromatogramas do teste de adsorção dos fármacos ao *acrodisc* utilizado na última filtração da amostra, nomeadamente, antes da injeção em HPLC-DAD. Nas **Tabela XV.1** e **Tabela XV.2**, podem ser consultados os valores das áreas dos picos e respetiva concentração de E2 e EE2 associada a cada amostra, sem filtração e com filtração através de *acrodisc*.

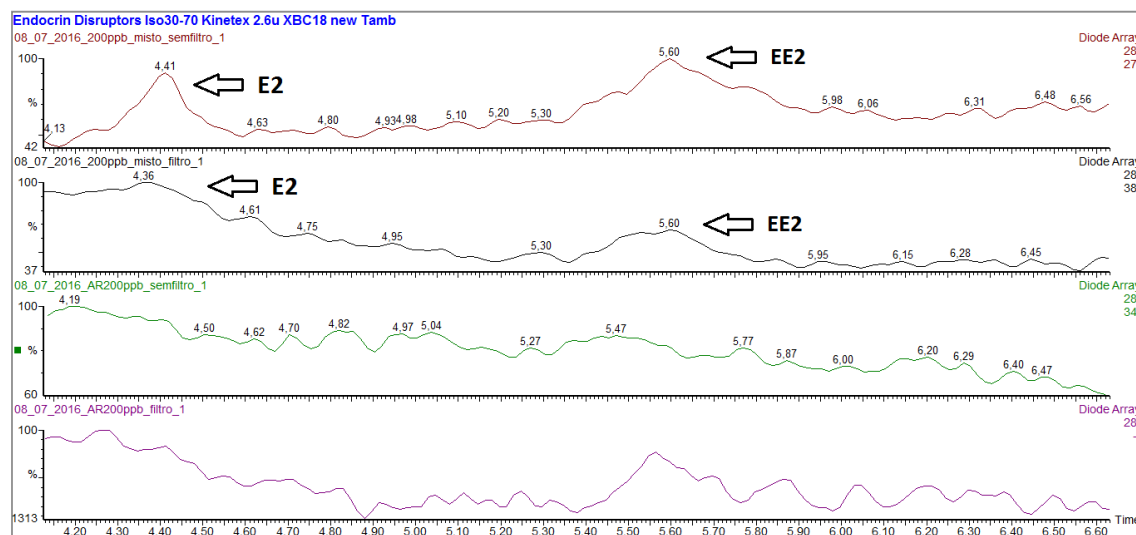


Figura XV.2. Cromatogramas correspondentes às amostras da solução mãe dos compostos e de água residual, com e sem filtração, ambas com uma concentração de $200 \mu\text{g.L}^{-1}$ de E2 e EE2 ($\lambda = 281 \text{ nm}$).

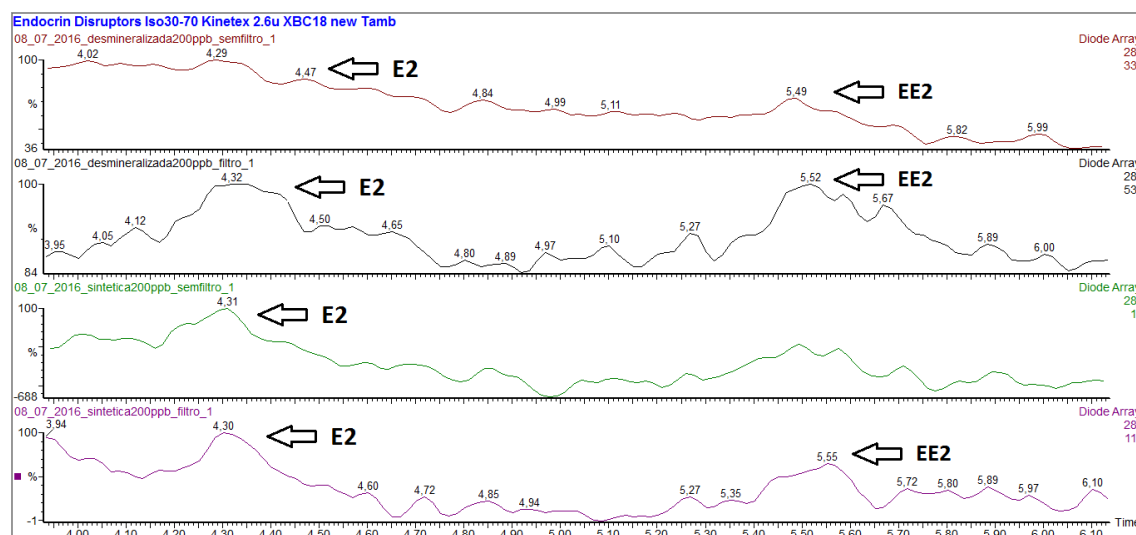


Figura XV.1. Cromatogramas correspondentes às amostras de água desmineralizada e de água residual sintética, com e sem filtração, ambas com uma concentração de $200 \mu\text{g.L}^{-1}$ de E2 e EE2 ($\lambda = 281 \text{ nm}$).

Tabela XV.1. Valores correspondentes aos tempos de retenção, áreas dos picos e concentrações de E2 e EE2, das amostras não filtradas.

S/ Acrodisc	E2			EE2		
	TRC (min)	Área	Concentração ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	TRC (min)	Área	Concentração ($\mu\text{g.L}^{-1}$)
Solução-mãe de E2 e EE2	4,4	11,42	61,13	5,6	7,53	56,37
AR	-	-	-	-	-	-
H ₂ O	4,5	1	24,79	5,5	2,03	35,71
AR sintética	4,3	2,13	28,73	-	-	-

Tabela XV.2. Valores correspondentes aos tempos de retenção, áreas dos picos e concentrações de E2 e EE2, das amostras filtradas com *acrodisc*.

C/ Acrodisc	E2			EE2		
	TRC (min)	Área	Concentração ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	TRC (min)	Área	Concentração ($\mu\text{g.L}^{-1}$)
Solução-mãe de E2 e EE2	4,4	3,06	31,97	5,6	10,56	67,76
AR	-	-	-	-	-	-
H ₂ O	4,3	6,32	43,34	5,5	2,63	37,97
AR sintética	4,3	4,23	36,05	5,6	9	61,90